

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



FIJACION BIOLÓGICA DE NITROGENO EN
FRIJOL DE TEMPORAL Y LA DIVERSIDAD
GENÉTICA DE LAS POBLACIONES NATIVAS
DE *Rhizobium*

TESIS:

QUE PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA

PRESENTA:

BIÓLOGO JESUS VASQUEZ ARROYO

MONTERREY N. L.

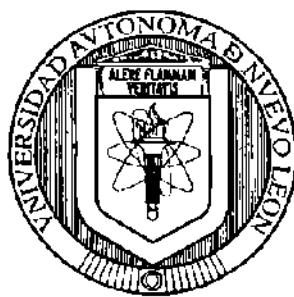
DICIEMBRE DE 1996

TD
QR89
.7
V3
c.1



1080073260

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**FIJACION BIOLÓGICA DE NITROGENO EN FRIJOL
DE TEMPORAL Y LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE
LAS POBLACIONES NATIVAS DE *Rhizobium*.**

TESIS

**QUE PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

PRESENTA:

BIOLOGO JESUS VASQUEZ ARROYO

MONTERREY N.L.

DICIEMBRE DE 1996

TD
QR 89
V3

Biblioteca Central
UANL
FONDO
TESIS
(73260)

Biblioteca Rangel
UANL
FONDO
POSGRADO

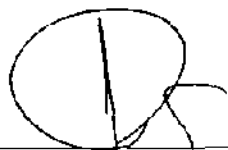
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

FIJACION BIOLÓGICA DE NITROGENO EN FRIJOL DE
TEMPORAL Y LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS
POBLACIONES NATIVAS DE *Rhizobium*.

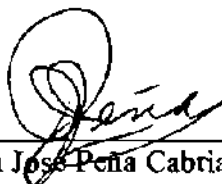
TESIS

QUE PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA PRESENTA

BIOLOGO JESUS VASQUEZ ARROYO



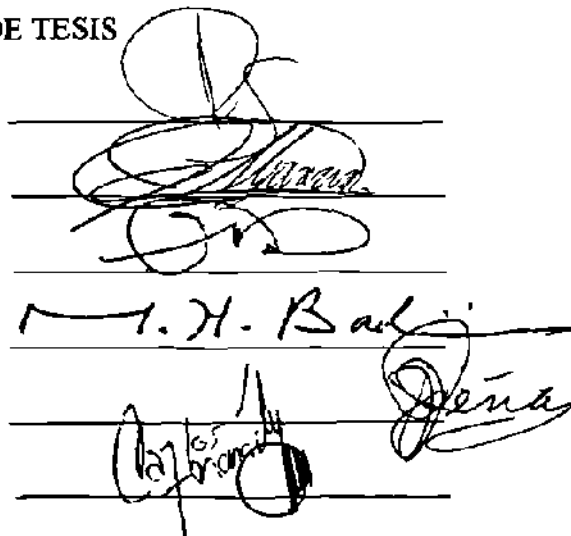
Dr. Benito Pereyra Alferez
DIRECTOR INTERNO



Dr. Juan José Peña Cabriales
DIRECTOR EXTERNO

COMISION DE TESIS

- Presidente: Dr. Benito Pereyra Alferez
Secretario: Dr. José Santos García Alvarado
Vocal: Dr. Luis Jesús Galán Wong
Vocal: Dr. Mohamed H. Badii
Vocal: Dr. Juan José Peña Cabriales
Vocal: Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna



MONTERREY, N.L.

DICIEMBRE DE 1996

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE ECOLOGIA MICROBIANA DEL CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL UNIDAD IRAPUATO, BAJO LA DIRECCION DEL DR. JUAN JOSE PEÑA CABRIALES, LABORATORIO DEL CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO, BAJO LA ASESORIA DE LA DRA. ESPERANZA MARTINEZ ROMERO

Y

LABORATORIO DE INMUNOLOGIA Y GENETICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON, BAJO LA DIRECCION DEL DR. BENTTO PEREYRA ALFEREZ.

RESUMEN

El cultivo de frijol en nuestro país es de vital importancia ya que es la fuente principal de proteínas para la población. Una característica importante de este cultivo es su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico cuando se asocia con bacterias del género *Rhizobium*. En general, las investigaciones han sido enfocadas a tratar de incrementar la eficiencia de este sistema. Sin embargo, hasta el momento los resultados han tenido poco éxito, ya que el frijol sigue siendo una de las leguminosas con menor capacidad de fijar nitrógeno. El problema reside básicamente en la escasez de estudios ecológicos relacionados con los simbioses. En ese sentido, se desconoce el papel que desempeñan en la economía del nitrógeno las poblaciones nativas, las cuales son ampliamente abundantes y diversas en los suelos de México. Adicionalmente, se piensa que las poblaciones nativas son las responsables del fracaso en la respuesta a la inoculación cuando se han utilizado cepas introducidas con alta capacidad de fijación de nitrógeno. El objetivo principal de este trabajo fue determinar en que medida las poblaciones nativas de *Rhizobium* contribuyen a la fijación biológica de nitrógeno en México. Asimismo, se evaluó el efecto que tienen las prácticas agrícolas sobre la diversidad genética de *Rhizobium*. Finalmente, se exploró la capacidad de las cepas nativas para establecer una selección preferencial por determinados genotipos de frijol. Un total de 59 aislados obtenidos de nódulos de tres genotipos de frijol ("Negro Querétaro", Flor de Mayo-M-38" y N-3-117"), cultivados en Fco. I. Madero, Dgo. fueron caracterizados por resistencia intrínseca a 12 antibióticos (RIA), Consensos Intergénicos Repetidos Enterobacteriales (ERIC)-PCR, análisis de PCR-RFLP's y Movilidad Electroforética de Enzimas (MLEE) de siete loci. Los resultados de campo empleando ^{15}N expresados como el % de N en la planta proveniente de la atmósfera (%N_{dda}) oscilaron entre 19 y 46, donde el genotipo Bayo Victoria fue el mejor y FM-M-38 el más bajo. Asimismo, se encontraron diferencias significativas entre el número de nódulos de Negro Querétaro respecto a FM-M-38 y N-3-117. Por otra parte, los análisis de PCR-RFLP's del gen 16S rRNA indicaron que la mayoría de los aislados pertenecen a la especie de *Rhizobium etli*. Adicionalmente, a través de técnicas de resistencia a antibióticos y ERIC-PCR, se pudo observar una amplia diversidad de las cepas nativas, encontrándose hasta 30 patrones diferentes. Sin embargo, los análisis de movilidad electroforética mostraron la existencia de un electrotipo sobresaliente (ET-1), el cual incluyó a 38 de los 48 cepas analizadas. Los estudios de competencia, empleado un transconjugante de *Rhizobium tropici* (CIAT-899::gusA₁₀-B), indicaron las cepas nativas fueron diferentes en su capacidad competitiva. De lo anterior se concluye que: 1) la fijación de nitrógeno parece ser importante aun bajo condiciones de temporal 2) *Rhizobium etli* es la especie dominante que nodula a los diferentes cultivares de frijol, 3) se observaron diferencias importantes en los diferentes métodos utilizados para caracterizar las cepas de *Rhizobium*, excepto para PCR-RFLP's y MLEE, 4) se observó una baja diversidad genética de *Rhizobium* (H=0.105) podría estar relacionada con las condiciones ambientales adversas de esta región y 5) Se observaron diferencias importantes en la capacidad competitiva (formación de nódulos) de las cepas de *Rhizobium etli*.

Los resultados de este trabajo representan una contribución al conocimiento de la ecología de las poblaciones nativas de *Rhizobium* spp. Adicionalmente, se aportan elementos que permitirán reconsiderar el potencial de estas poblaciones en los programas del mejoramiento de la fijación biológica de nitrógeno en frijol.

ABSTRACT

In México the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) crop, is considered as the main protein source for the human alimentation. An important characteristic of this legume is its capacity to nitrogen from the atmosphere when the plant interact with members of *Rhizobium* sp. The Effort for increase the seed production have been adressed to improved the efficiency of the symbiotic system. In this sense, the results have been not good, principally because the plant of bean is a legume poor of nitrogen fixation capacity. The basic problem reside in the scarcity of ecological studies in regard to simbiotes. In this way, the role of the native strains in the nitrogen economy to the plant is unknown, and this populations display a high both number and diversity. The principal objetives of this study were to evaluate the contribution of *Rhizobium* sp. native strains on the biological nitrogen fixation in Mexican field. So we evaluated the effect of the diversas agronomical practices under the genetic diversity of *Rhizobium*. Finally was explorer the capacity of native strains to establishment a preferencial selection by determined genotypes of beans. We are able to isolate 59 rhizobial strains obtained from Fco. I. Madero, Dgo fields from three genotypes "Negro Querétaro", "Flor de Mayo-M-38" and "N-3-11". These strains were characterized by intrinsic antibiotic resitance (IAR), PCR using Enterobacterial Repetitive Integenic Concensus (ERIC) primers, PCR-RFLP and analisis of Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE) by seven loci. PCR-RFLP's analisis of 16S rRNA gene showed that the most of strains belongs to *Rhizobium etli*. The result by IAR showed 30 different patterns, its important to mention that only three patterns were common to the three genotypes studied. ERIC-PCR also give a large number of patterns (32), however, there was no correlation between both methods. On the other hand, by MLEE analisis indicated that 38 of the isolates belong at the same electrotipe (ET-1), the rest correspond to seven ET's. The nitrogen fixing at field level showed a nitrogen derived from the atmosphere (Ndfa)= 19-46%, were the genotype Bayo Victoria gave the higher values while the Flor de Mayo M-38 was the lower. The nodule number showed high variability and differences significatives has been found in 2Negro Queretaro" with respect to FM-M-38 and N-3-117. In this way, are concluded that : i) N₂ fixation seems to be important even in rainfed conditions (%Ndfa 19-46). ii) *Rhizobium etli* is the dominant species nodulanting common bean, iii) from the different methods by the characterization, a good correlation between MLEE and PCR-RFLPs was foud, iv) the low diversity of *Rhizobium* found in this study (0.105) could be related to the adverse environmental conditions in this region and v) Gene marker *gusA*₁₀, was able to discriminated the competitiveness of native strains of *Rhizobium etli* associated to common bean.

DEDICATORIA

A quienes me dieron vida: María Remedios Arroyo Herrera y Margarito Vázquez Ibarra, los cuales siempre me han demostrado su apoyo y confianza para salir adelante.

A mi familia: Ana Elva Alva Castañón, Monserrat y Jesús Vázquez Alva, para quienes no tengo palabras para expresarles mi agradecimiento, simplemente se que la vida los premiará en la medida en que valoren sus sacrificios.

AGRADECIMIENTOS

Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. Por las facilidades y apoyos otorgados para la realización de los estudios de postgrado.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Por su contribución económica a través de los programas de becas de postgrado.

Universidad Autónoma de Nuevo León. Por la oportunidad de haberme formado y ser parte de ella en lo subsecuente.

Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Unidad Irapuato. Laboratorio de Ecología Microbiana. Por la disponibilidad del personal, facilidades de material y equipos de laboratorio para la realización del trabajo experimental.

Universidad Nacional Autónoma de México, Centro de Investigación sobre Fijación Biológica de Nitrógeno. Por su personal altamente calificado, Dra. Esperanza Martínez Romero, por las facilidades y el tiempo dedicado al presente trabajo.

Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación / Organismo Internacional de Energía Atómica. Por el

apoyo en el desarrollo de proyectos así como la capacitación y adiestramiento recibida a través de Angela Sessitsch.

A mis compañeros de laboratorio : Rodolfo Farías Rodríguez, Oscar A. Grageda Cabrera, Pedro E. Moreno Zacarias, José Antonio Vera Nuñez, Rosalinda Serrato Flores, Beatriz Flores Samaniego, Simón Rodríguez Castellanos y Ruth Nohemí Rodríguez Chávez. Por su amistad, apoyo y dedicación en la culminación de los estudios de postgrado.

Dra. Doralinda Guzmán de Peña, Por sus certeros consejos y atenciones brindadas, así como a José David Peña Guzmán, por la amistad demostrada siempre.

M.C. Hugo Luna Olvera, por su apoyo recibido en todo momento durante mi estancia en la Facultad de Ciencias Biológicas.

Familia Balcazar Tuefel, Ute, Juan y Bernardo, por su amistad y confianza brindada para conmigo y mi familia.

Para mis compañeros y personal de la Facultad de Ciencias Biológicas y del CINVESTAV, que de una u otra forma, contribuyeron para que el objetivo final se alcanzara.

RECONOCIMIENTOS

Dr. Juan José Peña Cabriales. Por su entrega y dedicación a la formación de recursos humanos en México.

Dr. Benito Pereyra Alférez. Por su amistad, consejos y dedicación a la culminación de nuestra meta trazada.

Dr. Luis J. Galán Wong. Por el apoyo recibido tanto en el aspecto académico, como humano durante nuestra formación.

Academia Departamental de Biología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna. Por el apoyo incondicional para llevar a cabo los estudios de postgrado.

Dra. Angela Sessitsch. Por su tolerancia y dedicación durante la capacitación y desarrollo del trabajo en la parte de biología molecular.

Dra. Esperanza Martínez Romero. Por su amistad y tiempo dedicado en la asesoría y conducción de parte de nuestro trabajo experimental.

ABREVIATURAS

a. e. = Átomos en exceso

ERIC= Consensos Intergénicos Repetidos Enterobacteriales

CR = Cultivo de referencia

cv = Cultivar

H = Diversidad genética

SDS = Duodecil sulfato de sodio

ER = Eficiencia Relativa

PAGE= Electroforesis en gel de poliacrilamida

ET = Electrotipos

PY = Extracto de levadura y peptona

ELMA = Extracto de levadura manitol

FBN= Fijación Biológica de Nitrógeno

GUS = Glucuronidasa

NHI = Índice de Cosecha de N

MMLac = Medio mínimo con lactosa

N= Nitrógeno

MLEE= Movilidad electroforética de enzimas

REP = Palíndromos Extragénicos Repetidos

RFLP = Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción del DNA

%Ndda = Porcentaje de N derivado de la atmósfera

%Nddf= Porcentaje de N derivado del fertilizante

% Ndds= Porcentaje de N derivado del suelo

PCR = Reacción en Cadena de la Polimerasa

INDICE DE CONTENIDO

Contenido	Página
Resumen	iii
Abstract	iv
Dedicatoria	v
Agradecimiento	vi
Reconocimientos	viii
Abreviaturas	ix
Indice de contenido	x
Indice de figuras	xiii
Indice de tablas	xv
Introducción	1
Hipótesis	1
Objetivo General	1
Objetivos Particulares	1
Antecedentes	3
I.- El Nitrógeno como Nutrimiento y su Importancia Agrícola	3
II.- Fijación Biológica de nitrógenos (FBN)	4
II.1.- Fijación simbiótica de nitrógeno.	4
III- Fijación Biológica de Nitrógeno en Frijol.	6
IV.- Taxonomía de <i>Rhizobium</i>	8
V.- Especificidad del Hospedero	16
V.1. Adhesión a la Raíz	16
V.2. Compatibilidad del Hospedero	16
V.3. Restricción de la Nodulación	18
VI- Diversidad Genética de <i>Rhizobium</i>	19
VII.- Poblaciones nativas de <i>Rhizobium</i> y competencia	20
IX.- Marcaje genético de <i>Rhizobium</i> con el gen reportero GUS.	24

CONTENIDO	Página
MATERIALES Y METODOS	28
Material Vegetal	28
Experimentos de Invernadero	28
Experimentos de campo con ^{15}N	29
Parámetros Analizados	30
Nodulación	31
Aislamiento de Cepas Nativas	31
Patrón de resistencia intrínseca a antibióticos	31
Aislamiento de DNA como Templado para la Técnica de PCR	32
Iniciadores REP y ERIC-PCR	32
Definición de Especies de <i>Rhizobium</i> Asociada(s) a Frijol	33
Cepas de Referencia	33
Preparación de Lisados para MLEE	33
Obtención de Perfiles de plásmidos	34
Obtención de Perfil de Proteínas Totales por Electroforesis en Geles de Poliacrilamida con Duodecil Sulfato de Sodio	34
Actividad Reductora de Acetileno	35
Marcaje de <i>Rhizobium</i> con el gen reportero GUS	37
Determinación de Materia Seca	37
Determinación de Rendimiento de Nitrogeno	38
Determinación del Nitrógeno Fijado por el Método de Dilución Isotópica	38
Análisis Estadístico	39
RESULTADOS.	40
Ensayos de invernadero	40
Experimento de campo con ^{15}N	41
Determinación de Materia Seca	42
Contenido de N total	43

Contenido	Paginas
Fijación de Nitrógeno	44
Rendimiento de Nitrógeno	46
Caracterización de Aislados de <i>Rhizobium</i> asociados a frijol	46
a).- Ribotipificación PCR-RFLP's.	46
b).- Caracterización por RIA	47
c).- Caracterización por ERIC2-PCR	48
d).- Movilidad Electroforética de Enzimas (MLEE)	49
e).- Perfil de plásmidos	53
f).- Perfil de Proteínas Totales (ID-SDS-PAGE)	53
g).- Actividad Reductora de Acetileno	54
Competencia de cepas nativas de <i>Rhizobium</i>	54
 DISCUSION	 58
Nodulación	58
Rendimiento de Materia Seca	60
Porcentaje de N ₂ Derivado de la Atmósfera	61
Caracterización de aislados de <i>Rhizobium</i> asociados a frijol	62
Actividad Reductora de Acetileno	71
Competencia de cepas nativas de <i>Rhizobium</i>	72
 CONCLUSIONES	 75
 PERSPECTIVAS	 76
 LITERATURA CITADA	 77
 ANEXO	 104

INDICE DE TABLAS.

	Página
Tabla 1. Nombres asignados a las bacterias que nodulan raíces.	9
Tabla 2. Cambios en la taxonomía de la familia Rhizobiaceae.	10
Tabla 3. Iniciadores utilizados para la amplificación por PCR en la familia Rhizobiaceae.	14
Tabla 4. Genes marcadores disponibles de uso potencial en la ecología de <i>Rhizobium</i> .	27
Tabla 5. Respuestas a la nodulación por cepas nativas de <i>Rhizobium</i> sp. en nueve genotipos de frijol bajo condiciones de invernadero a los 42 días después de la siembra.	40
Tabla 6. Respuestas a la nodulación por cepas nativas de <i>Rhizobium</i> sp. en nueve genotipos de frijol bajo condiciones de temporal en Francisco I. Madero, Dgo.	41
Tabla 7. Rendimiento en paja y grano (kg ha ⁻¹) en seis genotipos de frijol de temporal en Francisco I. Madero, Dgo.	42
Tabla 8. Rendimiento en paja y grano (kg ha ⁻¹) en seis genotipos de frijol de temporal en Dolores Hidalgo, Gto.	43
Tabla 9. Contenido de N total (%) en paja y grano en seis genotipos de frijol de temporal en Francisco I. Madero, Dgo.	44
Tabla 10. Contenido de N total (%) en paja y grano en seis genotipos de frijol de temporal en Dolores Hidalgo, Gto.	44
Tabla 11. Porcentajes de nitrógeno derivado de la atmósfera (%N _{dda}) en paja y grano en seis genotipos de frijol de temporal en Francisco I. Madero, Dgo.	45
Tabla 12. Resultados de rendimiento de nitrógeno (kg ha ⁻¹) en paja y grano en seis genotipos de frijol de temporal en Francisco I. Madero, Dgo.	46
Tabla 13. Definición de especie(s) de <i>Rhizobium</i> asociadas a frijol mediante el análisis de PCR-RFLP del gen de la subunidad 16S del rRNA	47

Tabla 14. Caracterización por resistencia intrínseca a antibióticos (RIA) de aislados de <i>Rhizobium</i> obtenidos de tres genotipos de frijol de temporal de Francisco I. Madero, Dgo.	47
Tabla 15. Patrones en común de RIA para los tres genotipos de frijol en estudio.	48
Tabla 16. Caracterización por ERIC-PCR de aislados de <i>Rhizobium</i> obtenidos de tres genotipos de frijol de temporal de Francisco I. Madero, Dgo.	48
Tabla 17. Caracterización de 46 aislados de <i>Rhizobium</i> obtenidos de tres genotipos de frijol por movilidad electroforética de siete enzimas.	49
Tabla 18. Número de nódulos formados en el genotipo "Negro Querétaro" en experimento de competencia, para determinar capacidad competitiva de tres cepas nativas contra el transconjugante CIAT-899- <i>gusA</i> ₁₀ -B	57

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ruptura del GUS al X-glucA para generar un derivado indol, el cual espontáneamente dimeriza para formar un precipitado azul.	26
Figura 2. Croquis de distribución de tratamientos en campo.	30
Figura 3. Dendograma de aislados de <i>Rhizobium</i> obtenidos de tres genotipos de frijol basandose en la movilidad electroforética.	51
Figura 4. Dendograma de aislados de <i>Rhizobium</i> que nodulan frijol de Durango y Viena, Austria (claves cb).	52
Figura 5. Perfil de plásmidos de diferentes cepas de <i>Rhizobium</i> asociadas a frijol.	53
Figura 6. Actividad reductora de acetileno de nueve cepas de <i>Rhizobium</i> inoculadas a tres genotipos de frijol, Negro Querétaro, FM-M-38 y N-3-117.	55
Figura 7. Formación de nódulos a los 10 (Panel A) y 15 días después de la inoculación (Panel B) de la cepa transconjugante CIAT-899:: <i>gusA</i> ₁₀ -B. El Panel C muestra la comparación de los nódulos formados por la transconjugante con y sin el gen <i>gus</i> .	57

INTRODUCCION

México es reconocido como centro de origen y domesticación del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Miranda, 1967) y, por ende, cuenta con una amplia diversidad de genotipos naturales; sin embargo, la producción de esta leguminosa es limitada. Es bien conocido que la producción de frijol depende de la asociación de la planta con especies nativas de *Rhizobium*, las cuales varían en especificidad de hospedero, efectividad de nodulación y fijación de nitrógeno (Araujo *et al.*, 1986; González-Cu y López-Reyes, 1989; Piñero *et al.*, 1988; Aguilar-Zacarias, 1990; Souza, 1990; Souza *et al.*, 1994).

Diversos estudios han permitido conocer que las cepas nativas son un obstáculo para encontrar una respuesta positiva a la inoculación. Los resultados obtenidos con cepas "elite" de *Rhizobium* sp durante el período 1975-1990, demostraron que únicamente el 11 % de los ensayos presentaron mayor rendimiento con respecto al tratamiento no inoculado. Esto indica que aún no es factible la explotación comercial de dicha estrategia bajo tales condiciones (Castellanos-Ramos *et al.*, 1993), lo que apoya la idea que el incremento de las cepas nativas de *Rhizobium*, disminuye el porcentaje de éxito por las cepas introducidas (Thies *et al.*, 1992). Este hecho nos conduce a pensar que el primer paso para obtener éxito en la inoculación y poder incrementar el rendimiento de frijol, es identificar a las cepas dominantes de *Rhizobium*. Uno de los principales enfoques para conseguir este objetivo, es la búsqueda de marcadores genéticos y bioquímicos, que nos permitan tanto la identificación y medir la diversidad genética entre miembros de la misma especie. Entre las principales metodologías moleculares se encuentran: la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción del DNA (RFLPs), Amplificación al Azar de ADN polimórfico (RAPDs) y Movilidad Electroforética de Enzimas (MLEE) (Piñero *et al.* 1988, Selander *et al.* 1986, Souza, 1990; Williams *et al.*, 1992; Souza *et al.* 1994).

A pesar de contar con una amplia riqueza de poblaciones nativas de *Rhizobium* asociadas a frijol, la información de la contribución de estas poblaciones a la economía del nitrógeno en la planta, es muy reducida. En nuestro país, aumentar la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en frijol, es de particular importancia, dado que esta leguminosa representa la principal fuente de proteína para la población (SAGAR, 1995). Las evaluaciones de la FBN utilizando el isótopo de ^{15}N , sobre diferentes genotipos de frijol, muestran que existen diferencias importantes en este

atributo. Los porcentajes de N derivado de la atmósfera oscilan entre 4-69 % (Renie y Kemp, 1983 a,b; Hardarson *et al.*, 1993 ; Peña-Cabriales y Castellanos, 1993). Esto demuestra la importancia de estudiar tanto la planta hospedera, como a las poblaciones nativas de *Rhizobium*.

Este tipo de estudios, nos permitirá responder a una serie de interrogantes fundamentales a cerca de la relación planta-bacteria; por ejemplo, ¿existe una preferencia selectiva por parte de genotipos de frijol hacia cepas de *Rhizobium* eficientes en fijar nitrógeno?, ¿cuál es la cantidad de nitrógeno que las poblaciones nativas de *Rhizobium* aportan a la planta de frijol?, ¿las diversas variedades de *Rhizobium* poseen la misma capacidad de competencia por nodular a la planta?. Responder a las interrogantes planteadas, nos permitirá conocer algunos aspectos sobre la ecología del sistema *Rhizobium*-frijol. Por lo anterior se propuso la siguiente hipótesis de trabajo.

HIPOTESIS

Las poblaciones nativas de *Rhizobium* sp asociadas a frijol llevan a cabo una interacción eficiente, particularmente en aquellos genotipos que se consideran buenos fijadores de N₂, contribuyendo de manera significativa en la economía del N de la planta. Así mismo, las diversas prácticas culturales, tienden a disminuir la diversidad genética de dichas poblaciones nativas.

OBJETIVO GENERAL

Conocer la contribución de las poblaciones nativas de *Rhizobium* sp. a la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) en diferentes cultivares de frijol bajo condiciones de temporal.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar la contribución de las poblaciones nativas de *Rhizobium* sp a la FBN en frijol bajo condiciones de temporal.
- 2.- Conocer si las diferentes cepas nativas de *Rhizobium* sp establecen una selección preferencial por determinados genotipos de frijol.
- 3.- Evaluar el efecto de las diferentes prácticas agrícolas, sobre la diversidad genética poblacional nativa de *Rhizobium* asociada a frijol.

ANTECEDENTES

L-El Nitrógeno como Nutrimiento y su Importancia Agrícola.

El nitrógeno (N) es uno de los elementos más importantes para la vida en nuestro planeta y puede existir en tres formas, molecular (gaseoso), orgánico e inorgánico. El N en su forma molecular, es el elemento más abundante de la atmósfera terrestre, pero éste se encuentra inaccesible para la mayoría de los organismos (Lehinger, 1978). De estas formas, en el suelo encontramos la forma orgánica (90%) e inorgánica (10%). En la forma orgánica, forma parte de macromoléculas y polímeros, principalmente como proteínas (30-40%), aminoazúcares (5-10%), purinas y/o pirimidinas (1-2 %) y en compuestos no identificables (50%). La forma inorgánica, generalmente se encuentra en un 10% como amonio, nitratos y N mineral (Fassbender, 1978).

El mayor aporte del N en la agricultura se da a través de la adición de fertilizantes nitrogenados, el cual se obtiene por síntesis química y es adicionado en forma de nitratos, urea, sales de amonio, etc. (Black, 1975). La demanda de N en la agricultura mundial, se ha incrementado en una tasa, aproximadamente equivalente, al incremento de la población mundial, *i.e.* alrededor del 2%. Sin embargo, la cantidad de N disponible no se incrementa a dicha tasa, en virtud de la continua disminución de la capacidad de suministrar N de los suelos agrícola (Herridge y People, 1995).

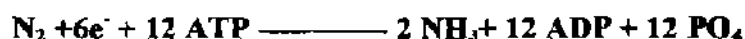
La mayoría de los sistemas agrícolas presentan una alta demanda de N. Por ejemplo, el arroz o trigo, requieren de 20-40 kg N ha⁻¹Tm⁻¹ de grano. Los pastizales, comúnmente utilizados como forraje para el consumo de ganado asimilan más de 100 kg de N Ha⁻¹. Una de las limitantes principales del rendimiento de estos sistemas es la disponibilidad de N en forma asimilable para la planta (People, 1994).

En 1992, para la producción de 2,228 millones de Tm de granos y oleaginosas, fueron empleadas 905 millones de Ha. Se ha estimado que para alcanzar estos niveles de producción se requerirán 80 millones de Tm de N, de las cuales, una proporción significativa, es reciclado del N residual de las leguminosas. El costo económico para solventar las necesidades de producción agrícola ascienden a \$33,000 millones de dólares (\$ 400 dls. ton⁻¹). De esta cantidad, la fijación biológica de nitrógeno (FBN) contribuye con el equivalente a \$5,000 millones. Esto significa que

si la FBN se mejorase un 15%, se lograría un ahorro equivalente a \$ 1000 millones (Herridge y People, 1995).

II.- Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN).

La FBN es un proceso reductivo que depende de la utilización de azúcares para la obtención de energía y compuestos reducidos (Atkins, 1986). Este proceso se puede generalizar de la siguiente manera:



La FBN es realizada por organismos procariontas y ésta se realiza en tres formas básicas, libre (*Klebsiella* sp., *Clostridium* sp.), asociada no simbiótica (*Azospirillum* sp., *Acetobacter* sp.) y asociada simbiótica (*Rhizobium* sp.) (Sprent, 1979; Drevon, 1983). De estas formas, la fijación simbiótica es la más importante desde el punto de vista de su significancia agrícola, por tal motivo, se han realizado grandes esfuerzos para entender los mecanismos fundamentales de dicha interacción.

II.1.- Fijación Simbiótica de Nitrógeno.

El establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-Frijol o cualesquier otra leguminosa, es el resultado de una compleja secuencia de interacciones que culminan con la formación de un nódulo en la raíz. Este es una estructura especializada, formado por varios tipos de células altamente diferenciadas, entre las cuales se encuentran las células infectadas. Dentro de éstas células se encuentra una forma especial de *Rhizobium*, a las cuales se les denominan bacteroides y son los responsables de llevar a cabo la fijación de nitrógeno (Dart, 1977; Sánchez, 1985; Dowling y Broughton, 1988; Michels y Vanerlyden, 1994).

Se ha demostrado que la fijación de nitrógeno depende de un complejo multienzimático conocido como nitrogenasa (Phillips, 1980; Sánchez, 1985). Este complejo consta de dos tipos de componentes: componente I, en esta parte se localiza el sitio de unión y reducción del sustrato

teniendo como cofactor al hierro-molibdeno y el componente II cuyo papel es el de reducir al componente I (Phillips, 1980; Robert y Brill, 1981).

El proceso de FBN es altamente reductor y es inhibido por O_2 , el cual es capturado por la leghemoglobina en los procesos simbióticos. Durante el proceso de fijación se libera H_2 en el nódulo y esta liberación, no se relaciona directamente con la tasa de actividad de la nitrogenasa, lo que probablemente indica que la actividad de una hidrogenasa que toma más H_2 en las simbiosis efectivas sea determinante (Hungria y Neves, 1987; Pereira *et al.*, 1989). Las observaciones encontradas por Hungria y Neves (1987), indican que el hospedero también puede influir en el metabolismo del H_2 , a pesar de que la eficiencia relativa (ER, capacidad de reutilizar el H_2 para la reducción de N_2) encontrada en frijol, es mucho más baja que la de soya o caupí (0.99), no es una conclusión generalizada para considerarlo como la causa principal de la baja fijación de N.

Desde el punto de vista energético, el proceso de fijación de nitrógeno consume de tres a cuatro veces más energía metabólica que la absorción y asimilación de N mineral (Atkins, 1986). De hecho, durante algunos períodos de crecimiento activo de la planta, del 30 al 50% de los carbohidratos producidos en la fotosíntesis neta diaria son consumidos por las raíces noduladas (Pete y Minch, 1980). Diversos estudios consideran que una de las principales limitantes del proceso de FBN es la disponibilidad de fotosintatos a los nódulos (Mahon, 1977 ; Hungria, 1988).

La cantidad de N tomada del aire y fijada por las bacterias de diferentes leguminosas, es difícil calcular, esta varía debido a factores como: clase de leguminosas, grado de efectividad de la bacteria, condiciones del suelo y factores climáticos (Alexander, 1980; Castellanos-Ramos, 1992; Ferrera-Cerrato *et al.* 1990; Graham, 1990; Hungria y Neves, 1987; Mellor, 1994; Peña-Cabriales *et al.* 1993). Sin embargo, se ha estimado que el aporte de N al suelo cultivados con leguminosas es de aproximadamente 12 millones de toneladas (Herridge y People, 1995).

Los sistemas simbióticos juegan un papel importante en los sistemas agrícolas ya que, además de reducir los costos de producción, evitan la contaminación de las aguas subterráneas, aumentan la producción de proteína (al incrementar la concentración de proteína de las leguminosas), contribuyen con N para cultivos sucesivos y fortalecer la fertilidad de los suelos (Hardarson, 1993b). Además, este sistema es el más estudiado por el potencial que representan en la incorporación del N_2 al suelo y es la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa el grupo más explotado en la agricultura. Se ha estimado que alrededor del 44% del nitrógeno fijado por medios biológicos

proviene de la citada asociación (Brill 1977). Sin embargo, entre las especies de leguminosas la capacidad de fijación de nitrógeno varía de 40-450 kg ha⁻¹ año⁻¹ (FAO, 1984).

En la agricultura, específicamente dos ejemplos de fijación biológica están siendo explotados de manera satisfactoria. Primeramente, las cianobacterias (algas azul-verdes) son de gran importancia en las áreas del cultivo del arroz a nivel mundial, seguidas por las bacterias del género *Rhizobium*, que se encuentran representadas globalmente en zonas templadas, tropicales, forestales y suelos cultivables (Jones, 1991).

III.- Fijación Biológica de Nitrógeno en Frijol.

México es reconocido como centro de origen y domesticación del frijol y por consecuencia cuenta con una amplia diversidad de genotipos (Miranda, 1967). En comparación con otras leguminosas de grano, el frijol se ha considerado como una planta pobre en la fijación de nitrógeno, lo cual podría ser debido a la baja ER de su simbiosis (Hungria y Neves, 1986a; Phia y Muns, 1987), simbiosis que depende del tipo de cultivar de frijol (Graham y Rosas 1977; Hungria y Neves, 1986a; Phia y Muns. 1987; Grageda-Cabrera. 1990; Castellanos-Ramos, 1992; Hardarson *et al.*, 1993). De este modo, se ha reconocido que los genotipos de hábito trepador presentan una mayor capacidad de FBN (Graham y Rosas. 1977). Miranda (1967), demostró que la diversidad biológica del frijol se ha incrementado con la domesticación y algunos de los caracteres que han aumentado son: hábitos de crecimiento, tamaño de hojas, flores, frutos, semilla y color de la testa.

La evaluación de la FBN depende de los parámetros evaluados y del estado fisiológico de la planta al momento de su determinación, por ejemplo madurez fisiológica, el índice de cosecha de N (ICN), proporción de N contenido en planta y en la semilla se ha encontrado por encima del 70% en frijol común (Westermann *et al.*, 1985; Miranda, 1987, Miranda y Bliss, 1991) sin embargo, para otras leguminosas el contenido de N total en la semilla fue positivamente correlacionado con el N de la semilla derivado de la fijación de nitrógeno atmosférico. Los datos de StClair y col. (1988), mostraron correlación fenotípica positiva sobre N total fijado, N total de la planta y semilla, peso seco de follaje y rendimiento en grano del frijol.

Experimentos a nivel de campo (realizados bajo las mismas condiciones de crecimiento clima, suelo y manejo), mostraron que la respuesta a la fijación simbiótica de nitrógeno es variable

y que ésta depende del genotipo de que se trate. En este sentido, en 1989 López-Alcocer y col. evaluaron 360 genotipos de frijol seleccionando 120; 58 por su capacidad simbiótica, 43 por rendimiento en grano y 19 por ambos parámetros. Los genotipos fueron seleccionados a partir de tratamientos inoculados + fósforo (40 kg ha⁻¹) y testigos sin inocular + fósforo. Por otra parte, empleando la técnica de dilución isotópica de ¹⁵N, se han encontrado valores promedio de 35% del N derivado de la atmósfera (N_{dda}), con un máximo de 58% (Hardarson *et al.* 1993). Otros estudios han establecido en cuanto a la cantidad de N fijado, que este cultivo alcanza valores de 25 a 71 kg de N ha⁻¹ en un período de 100 a 120 días (Graham y Rosas. 1977; Habish e Isagh, 1974;), mientras que Renie y Kemp (1983 a,b) reportaron valores de hasta 125 kg de N fijado y porcentajes de hasta un 68 % N_{dda}, con un promedio de 51.8%.

Hardarson y Danso (1993), señalan que para asegurar un manejo apropiado y óptimo beneficio de la simbiosis leguminosa-*Rhizobium*, es necesario realizar cuantificaciones de la cantidad de N fijado. No se cuenta con un método adecuado y correcto para determinar la fijación de N₂ por leguminosas. Ninguno de los métodos actuales: rendimiento de N, diferencias de N, ¹⁵N, reducción de acetileno y solutos del xilema (ureidos) resultan satisfactorios, estos pueden depender de la disponibilidad y adecuada determinación de la fijación de N₂ para cualesquier especie de leguminosa cultivada bajo todas las posibles variantes de suelo y ambientes. Cada método tiene ventajas únicas y limitaciones. En realidad cada método se ha empleado varias veces para evaluar la variación en fijación entre genotipos e identificar las líneas sobresalientes en programas de mejoramiento Harridge y Peoples (1995).

Los datos anteriores destacan la necesidad de implementar estudios interdisciplinarios en donde se involucre tanto a los cultivares de frijol, así como a las cepas nativo, para el desarrollar de programas dirigidos a incrementar la FBN. En el macrosimbionte, se han podido identificar genotipos con alta y pobre capacidad de fijación mientras que en el microsimbionte, los esfuerzos destinados a diferenciar cepas y poder llevar a cabo su seguimiento en condiciones naturales, no se ha puesto de manifiesto. En la definición de especies, las metodologías molecularesd Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y RFLP's, están aportando un avance sustancial a la sistemática bacteriana y mediante el empleo de genes reporteros, específicamente en el caso del gen de la glucuronidasa (GUS), se abre la oportunidad para realizar estudios de ecología de *Rhizobium*.

IV.- Taxonomía de *Rhizobium*.

Desde el punto de vista biológico, cuando se trabaja con una determinada población de organismos, el primer paso fundamental será el reconocer la especie de estudio de que se trata.

De acuerdo con Jordan (1984), el género *Rhizobium* descrito por Frank en 1889, son bacilos de 0.5 a 0.9 por 1.2 a 3.0 μm . Contienen gránulos de poli- β -hidroxibutirato, móviles con 2-6 flagelos peritricos o con un flagelo polar o subpolar, Gram-negativos, no forman esporas. Crecen sobre medios con carbohidratos generalmente acompañados de la producción de una gran cantidad de mucilago de polisacaridos extracelulares. Son capaces de invadir los pelos radiculares de la leguminosas e incitar a la producción de nódulos.

La sistemática bacteriana, se puede definir como el estudio científico de la diversidad de organismos y sus interrelaciones, con el objeto final de caracterizar y arreglar a éstos de una manera ordenada. La taxonomía también se usa como sinónimo para sistemática y consiste en la identificación, clasificación y nomenclatura. Al arreglo ordenado de unidades taxonómicas definidas (por ejemplo especie), se denomina clasificación. Una serie de diferentes métodos se emplean para la caracterización de un organismo, por lo tanto, una adecuada colección de datos, describe sus propiedades. Estas comprenden: características morfológicas, propiedades fisiológicas, composición química de la pared celular, membranas o contenidos genómicos de ácidos dexosirribonucleicos (ADN), contenidos de bases nitrogenadas guanina + citocina (G+C), perfiles de proteínas celulares totales, fragmentos de restricción del ADN y datos moleculares de secuencia (Ludwing y Schleifer, 1994).

En un principio, las especies de bacterias que nodulaban raíces fueron asignadas a géneros muy diferentes Tabla 1 (Young, 1994). Esta situación inestable ha cambiada, tanto por el mejoramiento en la caracterización de las bacterias y por los cambios en la idea de la naturaleza de un género bacteriano, situación que se agrava por la lenta diseminación de la información científica. Durante varias décadas, se generó un periodo estacionario en la sistemática de las bacterias que nodulan las raíces sin embargo, actualmente se encuentran en activa revisión, donde se destacan la valiosa participación del grupo mexicano del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno en Cuernavaca, Mor. los cuales han propuestos dos nuevas especies de *Rhizobium* que nodulan frijol en Latinoamérica. Martínez-Romero *et al.* (1991), determinaro que la especie

Rhizobium tropici es la que nodula frijol en regiones tropicales de Sudamérica, mientras que para el caso de México, se reconoce a la especie de *Rhizobium etli*, como la responsable de nodular al frijol de América (Segovia *et al.*, 1993) (Tabla 2).

Tabla 1. Nombres asignados a las bacterias que nodulan raíces*.

GENERO PROPUESTO	FECHA
<i>Schinzia</i>	1887
<i>Phytomixa</i>	1886
<i>Cladochytrium</i>	1888
<i>Bacillus</i>	1888
<i>Bacterium</i>	1890
<i>Rhizobium</i>	1889
<i>Pasteuria</i>	1891
<i>Rhizobacterium</i>	1895
<i>Rhyzobium</i>	1899
<i>Mycobacterium</i>	1901
<i>Pseudomonas</i>	1905
<i>Rhizomonas</i>	1909

* Adaptada de Young, 1994.

El aislamiento de un microorganismo, se define como el procedimiento, mediante el cual una especie dada de microorganismo presente en una muestra particular se obtiene en cultivo puro (Singleton y Sainsbury, 1981), mientras que una cepa, se considera como una célula o población de células que tienen las características dadas de un tipo de microorganismo o de un género particular o especie (Singleton y Salisbury, 1981).

Dentro de la especie de *Rhizobium*, la identificación de cepas es uno de los mayores problemas que se enfrenta el investigador en experimentos de inoculación en campo. En todo los sitio donde aparezcan de manera natural o se cultiven regularmente las leguminosas, existen

normalmente rhizobios que las nodulan. Por lo tanto, es aconsejable desarrollar técnicas simples que conlleven a identificar dichas cepas. Para que estos procedimientos sean útiles, deberán de ser

Tabla 2. Cambios en la taxonomía de la familia Rhizobiaceae*.

ESPECIES	AÑO DE PUBLICACION	REFERENCIA
<i>Rhizobium</i>	1889	Jordan, 1984
<i>R. leguminosarum</i>	1879	Jordan, 1984
bv. <i>viciae, trifoli, phaseoli</i>	1984	Jordan, 1984
<i>R. meliloti</i>	1926	Jordan, 1984
<i>R. loti</i>	1982	Jarvis <i>et al.</i> , 1982
<i>R. fredii</i>	1984	Scholla y Elkan, 1984
<i>R. galegae</i>	1989	Lindström, 1989
<i>R. tropici</i>	1991	Martínez-Romero <i>et al.</i> , 1991
<i>R. huakii</i>	1991	Chen <i>et al.</i> , 1991
<i>R. etli</i>	1993	Segovia <i>et al.</i> , 1993
<i>R. terenga</i>	1994	Lajudiee, 1994 Com. pers.
<i>R. shaeli</i>	1994	Lajudiee, 1994 Com. pers.
<i>R. cicer</i>	1995	Fernandez <i>et al.</i> , 1995
<i>Bradyrhizobium</i>	1942	Jordan, 1984
<i>B. japonicum</i>	1896	Jordan, 1984
<i>B. elkanii</i>	1992	Kuykendall <i>et al.</i> 1992
<i>Azorhizobium</i>	1988	Dreyfus <i>et al.</i> , 1988
<i>A. caulinodans</i>	1988	Dreyfus <i>et al.</i> , 1988
<i>Agrobacterium</i>	1942	Jordan, 1984
<i>A. radiobacter</i>	1902	Jordan, 1984
<i>A. rhizogenes</i>	1930	Jordan, 1984
<i>A. vitis</i>	1990	Kerr, 1990
<i>Phyllobacterium</i>	1962	Jordan, 1984
<i>P. mirsinacearum</i>	1962	Jordan, 1984
<i>P. rubiacearum</i>	1962	Jordan, 1984

* Adaptada de Young. 1994.

específicos y confiables, pero lo suficientemente simples para ser aplicados a un gran número de cepas (Beringer, 1978).

En algunos casos, el reconocimiento de cepas a nivel de laboratorio, puede realizarse por métodos tradicionales, considerando las características morfológicas. Una determinada cepa tiene una respuesta específica al hospedero, tal como: nodulación efectiva o inefectiva; distribución de nódulos en la planta, forma característica de los mismos y su coloración e incluso morfologías coloniales inusuales. Ninguna de esas características, es de aplicación general, aunque pueden ser útiles como criterios secundarios (Pastorini, 1992; Singleton y Tavares, 1986 ; Vincent, 1975).

La identificación de cepas de *Rhizobium* que ocupan los nódulos, es obligada en estudios que tienen por objeto evaluar la competitividad y el efecto de las cepas específicas, sobre el desarrollo de las leguminosas (Kremer y Peterson, 1982). Dentro de los métodos más comúnmente empleados se tienen: i).- resistencia a antibióticos ("inducida" e intrínseca) y los ii).- serológicos (aglutinación, inmunodifusión, inmunofluorescencia y ELISA); iii).- Patrones de proteínas totales y perfiles de plásmidos y iv).- métodos moleculares REP y ERIC-PCR así como movilidad electroforética de enzimas (MLEE).

El empleo de cepas de *Rhizobium* resistentes a alta concentración de antibióticos en estudios de ecología fueron propuestos por Obaton (1971) y empleados por Danso *et al.* (1973), Brockwell *et al.* (1977) y Kuykendall y Weber (1978). La más obvia aplicación de la técnica se da en los estudios de sobrevivencia, colonización y competitividad que son procesos asociados con la introducción de cepas al suelo (Cooper, 1979).

Por resistencia intrínseca a antibióticos (RIA), se demostró que existía una gran heterogeneidad, entre cepas de *R. leguminosarum*, *R. Phaseoli*, *R. meliloti*, y en *Rhizobium* del grupo caupí, el método ha sido cuestionado por ésta variabilidad (Kremer y Peterson, 1982; Stein *et al.*, 1982; Chanway y Holl, 1986).

La serología, es una parte de la bioquímica que se encarga del estudio de las reacciones de antígeno anticuerpo. La serología de *Rhizobium* ha sido útil en la elucidación de las relaciones taxonómicas entre especies y en su identificación rápida, cuando se aíslan de los nódulos (Dazzo y Hubbell, 1975). En general, se consideraba que las técnicas serológicas son confiables en la identificación de *Rhizobium*; sin embargo, Espinoza-Victoria *et al.*, (1989b) reportaron que la técnica de aglutinación, pone de manifiesto una gran cantidad de reacciones cruzadas en *R.*

leguminosarum bv. *phaseoli*, lo que indica la existencia de un alto número de antígenos compartidos entre cepas de esta especie.

Las técnicas serológicas de inmunodifusión han sido utilizadas en algunos estudios de campo y han demostrado ser más precisas que las pruebas de aglutinación en la identificación de cepas de *Rhizobium* (Kramer y Peterson, 1982). Dazzo y Hubell (1975), emplearon la técnica de inmunodifusión e inmunoelectroforesis, logrando discriminar entre el comportamiento de cepas inefectivas y no infectivas de *R. trifolii* por diferencias antigénicas. Así mismo, Van Rensburg y Strijdom (1985), Ramos y Boddey (1987) lo hicieron en *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*.

Estudios realizados en México por Espinosa-Victoria *et al.* (1989a), encontraron que la técnica convencional inmunoenzimática (ELISA) empleando anticuerpos policlonales, no se recomienda para la identificación de cepas de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, debido a que las cepas comparte en mayor o menor frecuencia un alto número de antígenos con PM entre 10 y 117 KDa. Por lo tanto, no se identificaron bandas antigénicas con características deseables es decir, específicas a la cepa y a alta concentración, que se tomara como base para la identificación de éstas.

Los modelos de perfiles de proteínas son útiles para subdividir grupos serológicos de especies de rhizobios. Resulta ser una poderosa herramienta para la identificación de cepas, sin embargo, el procedimiento es laborioso (Jackman, 1987; Pastorini, 1992).

Resultados en los cuales se ha empleado la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida empleando el detergente duodecil sulfato de sodio de una dimensión (SDS-PAGE) fueron llevados a cabo por Kamicker y Brill (1986), logrando distinguir mejor las cepas, que a través de la serotipificación en el caso de *Bradyrhizobium japonicum*. Para el caso de 11 cepas de *Rhizobium* que nodulan frijol en México (Espinosa-Victoria *et al.*, 1989), se empleando 60 µg de proteína por carril en la electroforesis, el número de componentes (bandas), fue contrastablemente diferente entre algunos de los extractos, no obstante, se organizaron tres grupos principales: grupo A; CPMEX-2 (29 bandas) y CPMEX-120 (31), grupo B; CPMEX-1 (36), UMR1116 (36), UNR1899 (36) y CP-102 (37) y el grupo C; CPMEX-119 (41), CPMEX-129 (43), CPMEX-131 (43) y CP-4 (45). En los 11 extractos, se encontraron 71 componentes diferentes, siendo los de máximo y mínimo peso molecular los de 167 y 10 kD. Estudios similares realizados en Chiapas (Arredondo-Peter y Escamilla, 1993), emplearon 50 µg de proteína por carril, encontraron un alto

grado de similitud entre las cepas aisladas de las diferentes localidades comparadas. En estas cepas de estudio, CIES-110 y CIES-113, contienen un péptido de bajo peso molecular que no fue detectado en el grupo de cepas de referencia empleadas.

Dentro de las diversas características presentes en la especie de *Rhizobium* se encuentra que cuentan con una gran cantidad de ADN extracromosómico en entidades denominadas plásmidos. Estos varían en número (1-10) y tamaño, pero en general son de alto peso molecular (100-300 megadaltones). Ellos pueden constituir un gran porcentaje del genoma celular, e.g. hasta 45% en el caso de *Rhizobium etli* (Martínez-Romero y Palacios, 1990 ; Martínez-Romero, 1994). En la mayoría de las especies rizobiales la mayoría de los genes requeridos en el proceso simbiótico están localizados en un plásmido, al cual generalmente se le conoce como plásmido *Sym* o *pSym*. Sin embargo, la mayoría de los rizobios también presentan, plásmidos que no son esenciales en el establecimiento de un estado simbiótico complejo, éstos se denominan no simbióticos o no *pSym* o simplemente megaplásmidos. (Mercado-Blanco y Toro , 1996). Existe una serie de funciones que se han encontrado en los plásmidos no simbióticos como son : síntesis de bacterocininas, eficiencia de nodulación, aumento o disminución de la efectividad, genes simbióticos reiterados, síntesis de exo y lipopolisacáridos, utilización de fuentes de carbono, síntesis de melanina, aumento o disminución del crecimiento bacteriano y supervivencia bajo diferentes condiciones ambientales Mercado-Blanco y Toro (1996).

Los perfiles de plásmidos para las diferentes especies de rizobios es muy diverso, en el caso de *Rhizobium* que nodulan frijol, una amplia diversidad se ha puesto de manifiesto (Martínez y Palacios, 1988; Brom *et al.*, 1988, 1990; Quinto *et al.*, 1982; Romero *et al.*, 1988; Martínez-Romero *et al.*, 1991; Segovia *et al.*, 1993), al igual que para *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* (Brockman y Bezdicek, 1989).

En la corta historia de la biología molecular, el surgimiento de una nueva técnica (e.g., Southern blotting, clonación molecular, electroforesis en gel de pulso y campo) han transformado las formas en que se pensaba acerca del discernimiento tanto de problemas biológicos aplicados como fundamentales. La capacidad de amplificar segmentos específicos de ADN, se ha hecho posible por la técnica de PCR, la cual representa una de las metodologías que han generado tales cambios. (Erich, 1989).

La PCR, es un método que se efectúa *in vitro* de la síntesis enzimática de secuencias específicas de ADN, empleando dos oligonucleótidos como iniciadores, que hibridizan con las hélices opuestas y flanquean la región de interés en el ADN blanco. Una serie repetida de ciclos, involucra la desnaturalización de la plantilla (ADN), alineamiento del iniciador y la extensión de este por medio de la enzima ADN polimerasa, resultando como tal, una acumulación exponencial del fragmento específico cuyas terminales son definidos por los extremos 5' de los iniciadores (Erich, 1989), dicho método fue inventado por Kary Mullis y originalmente aplicado en estudios de genética humana (Mullis y Faloona, 1987).

Para llevar a cabo una caracterización de cepas, mediante esta metodología, es conveniente, probar con un determinado número de iniciadores, los cuales pueden ser al azar (Berg *et al.* 1994; Kay *et al.*, 1994) denominado RAPD (de ADN Polimórfico Amplificado aleatoriamente), o bien ser más específicos para el género y/o especies de interés, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Iniciadores utilizados para la amplificación por PCR en la familia Rhizobiaceae.

Iniciador	Secuencia 5' a 3'	Referencia
REPIR-1	IIICGICGICATCIGGC	De Bruijn. 1992
REP2-1	ICGICTTATCIGGCCTAC	
ERICIR	ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAT	
ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGTGAGCG	
	GCTAGTTGGTGGGGTAA GCCATCTCAGTTCGGATTG	Willems y Collins, 1993
Y1 Y2	TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC CCCCTGCTCCTCCCGTAGGAGT	Young y col. 1991
G1 L1	GAAGTCGTAACAAGG CAAGGCATCCCAACCGT	Jensen y col. 1993
rD1 rD1	ccgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG cccgggatccaagcttAAGGAGGTGATCCAGCC	Weinsburg y col. 1991
RPO4 RPO5	GGAAGTCGCC AGTCGTCCCC	Richardson y col. 1995
RPO1	AATTTTCAAGCGTCGTGCCA	
nifH1 nifH2 nifH3	AAGTGCGTGGAGTCCGGTGG GTTCCGGCAAGCATCTGCTCG GCCAACACATCGCCAGGGGTAT	Eardly y col. 1992
2 4	TGCGCCGAATATGCGG GGTTATCGAAATCAGCCACAGCGC	Rossum y col. 1995

De Bruijn (1992), consideró que dentro del grupo de bacterias Gram-negativas, se encuentran consensos de ADN repetido, secuencias de Palíndromos Extragenicos Repetidos (REP) y Consensos Intergénicos Repetidos en Enterobacteriales (ERIC) y éstos, se han empleado con PCR para estudiar cepas de *Rhizobium meliloti*, encontrándose que resultaron ser altamente específicos para cada cepa. Ambos métodos REP y ERIC-PCR generaron grupos similares, considerándose que dichos métodos son útiles para la identificación y clasificación de cepas bacterianas. Resultados similares fueron encontrados por Sadowsky y Mowad (1995) y por Judd *et al.* (1993), éstos, señalan que el procedimiento es adecuado para la diferenciación de serogrupos genéticamente relacionados, como en el caso de *Bradyrhizobium japonicum* y *B. elkanii*. Sin embargo, es necesario que se considere que deberá optimizar las condiciones bajo las cuales se lleven a cabo las amplificaciones de ADN (Versalovic *et al.* 1994) y considerar que el empleo de un par de iniciadores no podrá ser de amplio espectro para poder caracterizar una amplia gama de especies dentro del género *Rhizobium* o *Bradyrhizobium*.

Finalmente, la movilidad electroforética de enzimas se ha empleado por muchos años en genética eucariótica. Hasta recientemente, se ha encontrado la utilidad de este método para estudios reconocidos de taxonomía bacteriana y evolutiva. Los datos proporcionados por esta metodología permiten además de la identificación de genotipos en una población, establecer las estimaciones de las relaciones entre organismos (Selander *et al.*, 1985). Nuevas especies han sido reconocidas (Selander *et al.*, 1986) y la clasificación de otras especies han sido confirmadas con MLEE (Segovia *et al.*, 1993).

Mediante MLEE, se identificaron 17 tipos electroforéticos (ET's) en 95 aislados de *Bradyrhizobium* recuperados de las cuatro hospederas, la mayoría de los aislados (73%) estuvieron representados por dos ET's (2 y 3), los cuales dominaron los nódulos de las leguminosas *Lupinus albus*, *Ornithopus compressus* y *Macroptilium atropurpuream* (Bottomley *et al.* 1994).

Segovia *et al.* (1991), determinaron la estructura genética de una población de *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* no simbiótica, por MLEE de ocho loci. Las cepas no simbióticas fueron aisladas de rizósfera de frijol y caracterizadas por crecimiento en medios diferenciales y a diferentes temperaturas, resistencia intrínseca a antibióticos, falta de homología del gen *nifH* y su incapacidad para formar nódulos con frijol.

V.- Especificidad del hospedero.

El poder obtener una nodulación exclusiva por una cepa altamente fijadora de nitrógeno en las leguminosas es una de las alternativas que se ha buscado por largo tiempo, sin embargo, los resultados no se han logrado y se continúan realizando grandes esfuerzos con tales propósitos. Dentro de los diversos mecanismos, se encuentra en el estudio de los factores de adhesión a la raíz, genes de compatibilidad al hospedero y restricción de la nodulación.

V.1.- Adhesión a la raíz. En el proceso de interacción simbiótica, se da un proceso específico de atracción entre el microsimbionte y la planta. Dicha especificidad es expresada en una etapa temprana del proceso de infección y resulta de múltiples interacciones de los productos de la bacteria y la planta. Dentro de ésta, se han sugerido a las lectinas de la raíz, como un determinante importante de la especificidad al hospedero. Díaz *et al.* (1989), señalan que diferentes grupos de leguminosas producen lectinas, las cuales difieren en su especificidad de unión a carbohidratos bacterianos.

La búsqueda de una explicación para el mecanismo(s) responsable para definir la especificidad de la interacción simbiótica en las leguminosas, se están avocando al estudio de señales lipooligosacáridas rizobiales (moléculas señal de nodulación o factor *Nod*) las cuales, en forma pura, son capaces de inducir la formación de primordios de nódulos y también completar las estructuras de nódulos en plantas hospederas. Sin embargo, se ha demostrado que aun y cuando determinadas cepas tanto de *R. loti* y *R. etli* presentan idénticos factores de nodulación, aquí las diferencias en tipos de hospederas no se encuentran en la estructura del factor *Nod* (Schultze y Kondorosi, 1995).

V.2.- Compatibilidad del hospedero. Dentro de los diferentes sistemas simbióticos, se ha estudiado la variación y la preferencia por cepas de *Rhizobium* en y entre cultivares de trébol blanco, donde por diversos estudios se ha demostrado que existe un gen específico del hospedero (Jones y Hardarson, 1979). En estudios realizados en trébol, se encontró que el cultivar (CV) S100, fue casi exclusivamente nodulado por la cepa 75Str y fue más efectiva que 33spc de igual forma, los Cvs. S184 y Pajbjerg prefiere a la cepa 33Spc la cual fue más efectiva en ambos. En líneas homogéneas derivadas de estolones de los tres genotipos, se encontró una preferencia más

uniformes para una determinada cepa de *Rhizobium*. La correlación encontrada entre la preferencia por plantas derivadas de semillas y las derivadas de estolones, demostraron que ésta preferencia se encuentra genéticamente controlada por el hospedero, siendo además, un carácter heredable, como se demostró por los resultados encontrados por Hardarson y Jones (1979), quienes realizaron cruza entre cultivares de trébol con un amplio margen de preferencia por cepas de *Rhizobium*. Los resultados demostraron que la herencia del carácter es altamente aditivo y sin dominancia o efecto maternal, caso contrario a lo que se encontró para chícharo por Lie y Timmermans (1983). En el caso de trébol, se señala que un mecanismo no específico adicional permite la adherencia selectiva rhizobial en grandes cantidades Hardarson (1984). Los carbohidratos unidos a proteínas como la trifolina, puede estar involucrado en el proceso de reconocimiento específico. Dicho reconocimiento, podría explicar la variación encontrada en su preferencia por *R. trifolii*.

Bromfield (1984), evaluó bajo condiciones de invernadero, la variación en la preferencia por cepas de *Rhizobium* en y entre cultivares de *M. sativa* y plantas cultivadas en jarras de Leonar en dos suelos diferentes. Los resultados indicaron, una considerable variabilidad en la preferencia por el hospedero entre plantas en los diferentes cultivares, pero no entre cultivares. Los cvs. de *M. sativa*, consistentemente presentan la misma preferencia por la cepa de *R. meliloti* en cada uno de los inoculos en particular. Sin embargo, estos resultados contrastan con los reportes en los cuales se involucra a *Trifolium spp.* (Jones y Hardarson, 1979; Hardarson y Jones, 1979) y *M. sativa* (Hardarson *et al.*, 1981; 1982; Heichel *et al.*, 1984) que indican diferente preferencia por especie o cultivar para una cepas específica de *Rhizobium* en una mezcla de inóculo. Tales variaciones se podrían esperar, debido a que los cv. de *M. sativa* empleados, fueron de polinización cruzada y como tal cada uno consiste de distintas poblaciones de plantas heterogéneas genéticamente. Esto puede indicar que el tipo de suelo o la población nativa, influye en la preferencia por el hospedero (Bromfield, 1984).

Mediante estudios de biología molecular (Innes *et al.*, 1985, Djordjevic *et al.*, 1985, 1986) se determinó la existencia de tres loci (designadas como regiones: III, IV y V), las cuales son las responsables de establecer la clase de hospedera. Mutaciones en las regiones específicas del gen *nod* afectaron la capacidad de la nodulación en trébol. La introducción a *R. leguminosarum* de fragmentos de ADN, extienden la clase de hospederos. Cuando se realizó únicamente la

introducción de la región IV a la cepa ANU843 curada de plásmido *sim*, se encontró una marcada recuperación del proceso de encurvamiento del pelo radical, pero no de los eventos de infección o aparición de nódulos. Únicamente se recupera el fenotipo silvestre en la cepa ANU843 curada del plásmido, cuando se introducen las tres regiones.

V.3.- Restricción de la nodulación. Una de las posibles formas de incrementar los rendimientos en las leguminosas mediante la explotación biotecnológica de *Rhizobium*, es la generación de genotipos que presenten una restricción por las cepas nativas y sean nodulados únicamente por la cepa inoculada. Diversos estudios empleando el sistema de "raíz dividida" en trébol, se ha encontrado que el retardo en la aplicación del inóculo en uno y otro lado de la raíz, dispara una respuesta de supresión en la formación de nódulos (Sarget *et al.*, 1987). Mediante dicho modelo, se ha puesto de manifiesto que la respuesta de supresión está aparentemente bajo el control de la planta hospedera (Akao *et al.*, 1994; Djordjevic *et al.*, 1985, 1986; Innes *et al.*, 1985; McIiver *et al.*, 1989).

En la soya (*Glycine max*), se ha determinado que la planta hospedera presenta mecanismos que restringen la nodulación por determinadas cepas de *Bradyrhizobium japonicum*. Estudios en los cuales se han empleado diversos genotipos inoculados con diferentes grupos de *B. japonicum*, han permitido definir a aquellos que presentan un efecto preferencial por una determinada cepa con mayor eficiencia (Lohrke *et al.* 1995; Cregan y Keyser 1986; Cregan *et al.* 1989; Cregan y Sadowsky, 1989; Ferrey *et al.*, 1994; Keyser y Cregan, 1987; Pierce y Bauer, 1983; Prach *et al.*, 1994 ; Sadowsky *et al.* 1991; Sadowsky y Cregan ,1992; Sadowsky *et al.* 1995; Weismar *et al.* 1990).

Sadowsky *et al.* 1995, demostraron que la restricción de la nodulación está controlada por el hospedero y es autónoma para la raíz e independiente de algún factor probablemente expresado en tallo. En otros trabajos (Delves *et al.*, 1986) se señalan que la no nodulación y la supernodulación se disparan esta controlada por parte la raíz, en *Glycine max* cv. Bragg. Así mismo, Sadowsky y col. (1995), encontraron que la temperatura afectó la restricción de la nodulación controlada por el hospedero y que ésta, no está relacionada con la cepa infectante. Los resultados encontrados, están de acuerdo con los reportados por Lie (1984), quien señala que las diferencias en temperatura afectan la interacción de cepas específicas de *R. leguminosarum* en

chicharo y en éste caso un gen dominante (*sym1*), condiciona la restricción de la nodulación sensible a la temperatura.

Actualmente se conoce que las cepas de *R. meliloti* inducen nódulos efectivos únicamente en las especies de *Medicago*, *Mellilotus* y *Trigonella*. Mediante mutagénesis con Tn5, se han establecido dos grupos de genes *nod* específicos a las especies de *R. meliloti* (Regiones IIIa y IIIb) en la cepa RCR2011. A través de diversos experimentos se ha demostrado que éstas regiones están involucradas en la especificidad al hospedero por el encurvamiento del pelo radical y la formación de cordón de infección (Debelle y Sharman, 1986).

VL- Diversidad genética de *Rhizobium*.

La diversidad biológica, comprende a toda las especies de plantas, animales, microorganismos, al ecosistema y procesos ecológicos de los cuales forman parte (McNeely *et al.*, 1990). La diversidad genética; es la suma total de información genética contenida en los genes individuales de plantas, animales y microorganismos que habitan la tierra (McNeely *et al.*, 1990), se habla de una comunidad alfa, cuando se estudia la diversidad de especies dentro de un hábitat o comunidad particular (Lincoln *et al.*, 1995).

Una de las formas para demostrar la diversidad genética tanto de bacterias como de eucariotas, es mediante el estudio de las variantes electroforéticas de actividad enzimática, las cuales se han aplicado para el caso de *Rhizobium* (Segovia *et al.*, 1991) sin embargo; ésta no se ha correlacionado con la efectividad de las cepas bajo condiciones de invernadero. De manera general, se ha considerado a *Rhizobium* como uno de los géneros con la más alta diversidad genética reportada, incluyendo a especies de bacterias bien estudiadas como la *Escherichia coli*. Esta diversidad cromosómica, sugiere en el caso de *Rhizobium* que nodulan frijol común es una mezcla polifilética de cepas (Romero *et al.*, 1988). Por el contrario, los estudios de *Rhizobium* asociados a *Phaseolus coccineus*, presentaron un bajo nivel de intercambio genético con otras poblaciones del suelo y una baja diversidad en términos de variación en los pesos moleculares de las proteínas (Arredondo-Peter y Escamilla, 1993). Sin embargo, ésta se atribuyo a que los aislados fueron obtenidos de una estrecha área geográfica del sureste mexicano, resultados

similares fueron encontrados por Young (1985), en estudios realizados en Inglaterra, empleando estudios de movilidad electroforética de enzimas.

En México, se ha trabajado con esta metodología, para determinar la estructura y diversidad genética de las poblaciones de *Rhizobium* que nodulan frijol (Piñero *et al.*, 1988; Segovia *et al.*, 1993; Souza, 1990; Sousa *et al.*, 1994) y poblaciones no nodulantes (Segovia *et al.*, 1991). Se considera que los sitios probables de domesticación, presentaran una alta diversidad de rhizobios. En esta enorme poza genética, se podrá encontrar cepas capaces de fijar N₂ y nodular leguminosas en diferentes hábitat y con alta eficiencia (Souza *et al.*, 1994). Así mismo; se ha encontrado una amplia diversidad genética y diferencias entre poblaciones de *Rhizobium* sobre una pequeña escala espacial y temporal, de manera que la presencia de recombinaciones indican que en estas bacterias, los nuevos genes podrían fácilmente escapar a la población nativa, lo cual sugiere que la recuperación y éxito de una cepa particular modificada e introducida de *Rhizobium etli* puede ser muy bajo Souza *et al.* (1994).

Normalmente, muy poca o ninguna variación se encuentra dentro de la secuencia genética de la subunidad 16S del ácido ribonucleico ribosomal (RNAr) en una especie, pero diferentes especies generalmente presentan secuencias diferentes. No todos los genes o macromoléculas son marcadores filogenéticos útiles y no todas las moléculas marcadoras filogenéticas son útiles para el análisis de grupos de bacterias con fines filogenéticos (Schleifer y Ludwig, 1994). Sin embargo, recientemente se ha considerado la posibilidad de que en el caso de *Rhizobium*, por transferencia horizontal de los genes ribosomales, éstos esten participando de tal manera que sean los responsables de la amplia diversidad genética para éste tipo de especie en particular (Eardly *et al.*, 1995; Ueda *et al.*, 1995).

VII.- Poblaciones Nativas de *Rhizobium* y Competencia.

Las bacterias del suelo pueden colocarse en dos grandes grupos: las especies nativas o autóctonas que son residentes verdaderos y los organismos invasores o alóctonos. Las poblaciones nativas pueden presentarse en estados resistentes y perdurar por largos periodos sin tener actividad metabólica, pero en determinado momento, estas formas proliferan y participan en

funciones bioquímicas de la comunidad. Las especies alóctonas, por el contrario, no participan de manera significativa en las actividades de la comunidad (Alexander, 1980).

Un problema económicamente importante en la ecología microbiana, concierne a la eficiencia de los inoculantes rizobiales en la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en leguminosas de cultivo como la soya, el trebol y la alfalfa. Algunas cepas pueden incrementar significativamente la fijación bajo condiciones controladas. Sin embargo, mejorar dicha fijación bajo condiciones de cultivo por dichas cepas han fallado, generalmente como resultado de la presencia de cepas nativas, las cuales limitan la nodulación de las cepas introducidas. Este problema es referido como problema de competencia de *Rhizobium*. Genetistas moleculares están dirigiendo el problema en dos perspectivas. Primero, el hospedero específico de la rizobia está siendo caracterizado con el objetivo final de desarrollar cepas que puedan nodular específicamente a un genotipo hospedero. Segundo, las bases genéticas de competitividad están siendo estudiadas, donde determinantes genéticos de ésta han sido aislados y su integración estable al genoma de cepas superiores en fijación de nitrógeno se está llevando a cabo. Diversos fenotipos se han identificado que juegan un papel importante en la competitividad incluyendo antibiosis, motilidad, rapidez de nodulación, características de superficie celular y eficiente nodulación (Triplett y Sadowsky, 1992).

La competencia por ocupar nodulos por las diferentes cepas rizobiales es un área compleja y controversial en los estudios de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Muchas variables ambientales participan, así como características intrínsecas de los rizobios y determinantes genéticos del hospedero las cuales contribuyen para una satisfactoria o falla de la cepa rizobial para ocupar significativa proporción de nódulos, bajo una serie dada de condiciones (Thies *et al.*, 1992), siendo además la nodulación una de las características importantes que se deberán considerar dentro de los programas para incrementar la fijación de nitrógeno (Hardarson, 1993b).

Factores ambientales que afectan la competencia nodular incluyen la presencia de cepas nativas de rizobia (Bohlool y Schmidt, 1973; Wever y Frederick, 1974a,b; Thies *et al.*, 1991), tipo de suelo (Ham *et al.*, 1971), temperatura (Klusa *et al.*, 1986), humedad (Boonkered y Weaver, 1982), pH del suelo (Duhng y Bottomley, 1983,1984), disponibilidad de N (Abaidoo *et al.*, 1990) y antagonismo microbiano (Triplett y Barta, 1987).

En México se cuenta con una gran diversidad de cepas nativas de *Rhizobium* (Piñero *et al.*, 1988 ; Segovia *et al.*, 1991 ; Souza, 1990 ; Souza *et al.*, 1994) y con una amplia variabilidad en efectividad. Se ha señalado por Alexander (1980), que el 75% del total de las cepas nativas de *Rhizobium* no son efectivas, sin embargo, dicho porcentaje no corresponde del todo con lo reportado en otros trabajos, como en Ruanda, donde se han encontrado que el 75% de cepas nativas fueron eficientes (19% altamente efectivas y 58% efectivas) en el cultivo de frijol (Lalalde *et al.*, 1990). En México se han encontrado valores de 77.3% para *R. leguminosarum* (Mendoza-Gamboa, 1987) y para Turquía y Jordania se encontraron valores promedio superiores al 50 % (Moawad y Beck, 1991).

La fijación de nitrógeno en ecosistemas agrícolas raramente se limita por la ausencia de microorganismo efectivos en fijar N_2 , más bien se limita debido a la carencia por parte de estos microorganismos de atributos que les permitan tener una buena capacidad saprofítica (Alexander, 1985). Se ha demostrado que las cepas nativas de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* son saprofíticas y competitivas (Aguilar-Zacarias, 1990), donde el intercambio genético natural parece determinar en parte, la amplia gama de cepas y a la vez la efectividad (Brom *et al.*, 1991 ; 1992).

Weiser *et al.* (1985), señalaron que una satisfactoria nodulación e incremento del rendimiento en grano de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), no se le observó después de la inoculación con *R. phaseoli*. Las cepas inoculadas produjeron un mayor número de nódulos, tejido nodular y tamaño en relación a las cepas nativas. El desarrollo nodular temprano puede proveer N para un vigoroso crecimiento vegetativo y soportar altos rendimientos. Los resultados indicaron que la nodulación del frijol por la inoculación con una o más cepas en mezcla, podrán aumentar los rendimientos en grano en aquellos suelos aun conteniendo cepas nativas y altos niveles de N.

Pineda y Kipe-Nolt (1990), observaron que al inocular cepas nativas se incrementó la nodulación y los rendimientos de frijol de 1654 a 2224 kg ha⁻¹, los cuales fueron similares al aplicar 180 Kg ha⁻¹ de N como Urea (2477 kg ha⁻¹).

Lalalde *et al.*, (1990), aislaron 48 cepas de *R. leguminosarum*. bv. *phaseoli* de nódulos de frijol cultivado en 32 diferentes suelos de 22 diferentes localidades en Ruanda. La efectividad de las cepas fue estimada en invernadero por la determinación de materia seca y N total, después de seis semanas de crecimiento. De las cepas evaluadas, 19, 58 y 23 % fueron consideradas como muy efectivas, efectiva e inefectivas respectivamente. Resultados estadísticamente significativos se

encontraron entre materia seca y N total. Por ejemplo, por balance de N se determinó que en presencia de una cepa muy efectiva, más del 86% del N presente en los brotes proviene de la fijación de nitrógeno.

Las características de la rhizobia que pueden influir el resultado de la competencia incluyen: compatibilidad del genotipo hospedero (Keyser y Kregan, 1987), motilidad y respuesta quimiotáctica (Hunter y Fahringer, 1980; Wadisirisuk *et al.*, 1989), capacidad para adherirse a la raíz e iniciar la formación de nódulos (Dart, 1977).

Para el caso de México, existe un amplio rango de capacidad competitiva entre cepas de tipo I (*R. etli*) CFN-42, la cual es una cepa pobre competidora especialmente si se le compara con Viking 1, ésta ha sido descrita como una buena competidora para suelos de Estados Unidos y TAL-182 lo es para suelos de Hawaii. Se considera importante el identificar marcadores genéticos que proporcionen a la cepa una ventaja selectiva para competir y al parecer los estudios realizados con el plásmido b de las cepas de *R. tropici* CFN-299, podría ser considerado (Martínez-Romero y Rosenblueth, 1990). Sin embargo, la tendencia a ocupar un mayor número de nódulos por una determinada cepa empleada como inoculante, está directamente influenciada por la concentración del inóculo bajo condiciones controladas (George y Robert, 1992). En estudios de campo no se tienen evidencias de que la competitividad de la cepa este en función del número de células en la rizosfera (Abaidoo *et al.*, 1990; Moawad *et al.*, 1984; Robert y Schmidt, 1983).

Las poblaciones de *Rhizobium* en el campo son fenotípica y genéticamente diversas y son muy adaptables como un todo. Se cuenta con evidencias de que las características de especificidad al huésped entre rhizobios de rápido crecimiento y la nodulación, se encuentran en un plásmido y además se segregan a subpoblaciones (Young, 1985; Soberón-Chavez *et al.*, 1988). Por ejemplo, Young (1985) encontró en un área de 100 m² sembrados con *Medicago sativa* (sin inocular), 45 cepas diferentes en 100 plantas tomadas al azar y concluyó que los *Rhizobium* aislados, representan poblaciones diferentes las cuales pueden llevar diferentes determinantes del tipos de hospederos, en virtud de la posibilidad de intercambio genético en el suelo, lo cual ha sido confirmado por diversos autores (Singleton y Tavares, 1986; Schofield *et al.*, 1987; Veal *et al.*, 1992).

Los resultados experimentales realizados en diferentes sistemas simbióticos indican que los plásmidos juegan un papel importante en el proceso de la nodulación, ya que la

transferencia de éstos ha demostrado incrementan la nodulación o fijación de nitrógeno en *R. leguminosarum* bv. *viciae* (DeJonj *et al.*, 1982) y se ha reportado que la pérdida de un plásmido mejora las propiedades simbióticas de *Rhizobium loti* (Pankhurst *et al.*, 1986). En *R. meliloti*, un plásmido no simbiótico aumentó la nodulación de esta cepa, dicho plásmido pudiera estar relacionado con la modificación en la síntesis de exopolisacaridos y conferir sensibilidad a algunos fagos (Toro y Olivares, 1986), así mismo, algunas cepas sensibles a succinato han demostrado tener propiedades simbióticas de incrementar competitividad por nodulación (Urban, 1988).

Se han reportado para el caso de México en alfalfa, una eficiente relación simbiótica entre las cepas nativas predominantes y la especificidad por la variedad de alfalfa, la cual se ha mantenido en la región del Bajío Guanajuatense por muchos años (Olalde, 1986). Es posible esperar encontrar una situación similar para el caso del cultivo de frijol para las diferentes zonas agroecológicas del país, donde el cultivo prácticamente se originó con la agricultura.

4.9. Marcaje genético de *Rhizobium* con el gen GUS.

Un problema que impide la satisfactoria aplicación de inoculantes rhizobiales, es el conocer el destino que la bacteria sigue en el campo. Directamente no se puede ver y distinguir cepas individuales de rhizobia. Tampoco es factible determinar que nódulos se formaron por la cepa inoculada, excepto en raros casos, donde una de las cepas rhizobiales produce un pigmento tal como la melanina (Eaglesham *et al.*, 1982 ; Cubo *et al.*, 1988).

Para estudiar el establecimiento y supervivencia del inoculo, es necesario detectar y cuantificar la cepa inoculada en el campo. Esto, invariablemente se alcanza a través del uso de marcadores moleculares; es decir moléculas que sirven para distinguir una especie o cepas de otras. Dos de los factores claves limitantes para la solución de estos marcadores serán : el nivel de discriminación deseado y la tecnología disponible (Wilson, 1995a).

Existen además diversas consideraciones que deberán ser tomadas en cuenta para la elección de un marcador, la primera es que los ensayos esten disponibles para su utilización. Estos deberán ser simples técnicamente, altamente sensibles y disponibles, ya que estos podrán ser utilizados rutinariamente en el campo de la ecología más que para uso de laboratorios con altas tecnologías. Así mismo, se deberá considerar el aspecto del efecto ecológico del gen introducido,

las modificaciones al ambiente deberan ser mínimas si se va a utilizar el gen en estudios de ecología y finalmente, en virtud de que un gen marcador por definición origina organismos alterados genéticamente, deberá ser importante considerar la posible transferencia de genes de los organismos transformados y considerar el riesgo que tales organismos podrán crear al ser éstos liberados al ambiente (Wilson, 1995a).

Recientemente se ha desarrollado un sistema que utiliza el gen *gusA*, que codifica para la enzima hidrolítica GUS (β -glucuronidasa) (Jefferson *et al.*, 1986), como marcador para estudios de capacidad de competencia entre cepas de *Rhizobium* (Wilson *et al.*, 1991, Wilson *et al.*, 1995b). Los nódulos ocupados en la raíz por la cepa marcada, se podrán identificar por el desarrollo de un producto coloreado, después de que el sistema radical se someta a un sustrato apropiado para la enzima.

El marcador GUS, en comparación con otros sistemas, es altamente factible para estudios de ecología. El ensayo es extremadamente simple, el sistema radical se saca del suelo se incuba en una solución amortiguadora de fosfatos que contiene el sustrato para GUS, X-glc-A (Acido, 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil- β -D-Glucurónico) (Tabla 4). La enzima rompe el compuesto XglcA para liberar un derivado indoxilo, que dimeriza hasta formar un precipitado índigo (Wilson, 1995a, Sessitsch, 1995)(Figura 2).

La enzima GUS, opuede romper una amplia gama de sustratos además del X-glcA, hidroliza tantos compuestos aglicones -la fracción indoxilo del XglcA- que se conjugen (Jefferson y Wilson, 1991, Wilson *et al.*, 1995b).

Ensayos cuantitativos para poblaciones de bacterias del suelo que dependen de GUS, como un marcador de selección, producen colonias coloreadas. Así mismo, en cultivo puro, ensayos cuantitativos de la enzima se pueden llevar a cabo, empleando sustratos que use GUS y que alcancen a general color (p-Nitrofenol Glucurónico, pNPG) o productos fluorescentes (pMetil-Umbefiril-Glucurónico, MUG) (Jefferson y Wilson, 1991).

Finalmente, los sustratos glucurónicos normalmente no se encuentran en las plantas o bacterias. Por lo tanto, GUS es poco probable que interfiera con algun proceso metabólico central de la célula. (Wilson, 1995a).

Dado que el frijol es uno de los principales alimentos de la población de nuestro país se justifican todos los esfuerzos destinados ha incrementar la producción. Una de las alternativas es

hacer más eficiente la fijación de N en este cultivo. Se ha demostrado que lograr incrementos de un 10% en la capacidad de fijación de N_2 , representaría un ahorro económico significativo. No obstante los esfuerzos realizados, de las diversas investigaciones encaminadas a incrementar la FBN, el éxito esperado no se ha logrado.

Uno de los problemas más importantes están relacionados con la presencia de cepas nativas de *Rhizobium* en los suelos de México. Se conoce que las cepas nativas son altamente competitivas pero inefectivas en fijar N_2 . Así mismo, éstas logran desplazar a cepas de *Rhizobium* introducidas que han sido seleccionadas por su alta capacidad de fijación de N_2 .

Los resultados de este trabajo contribuyen de manera significativa a comprender el comportamiento de las cepas nativas y deberán ser tomadas en cuenta en investigaciones futuras.

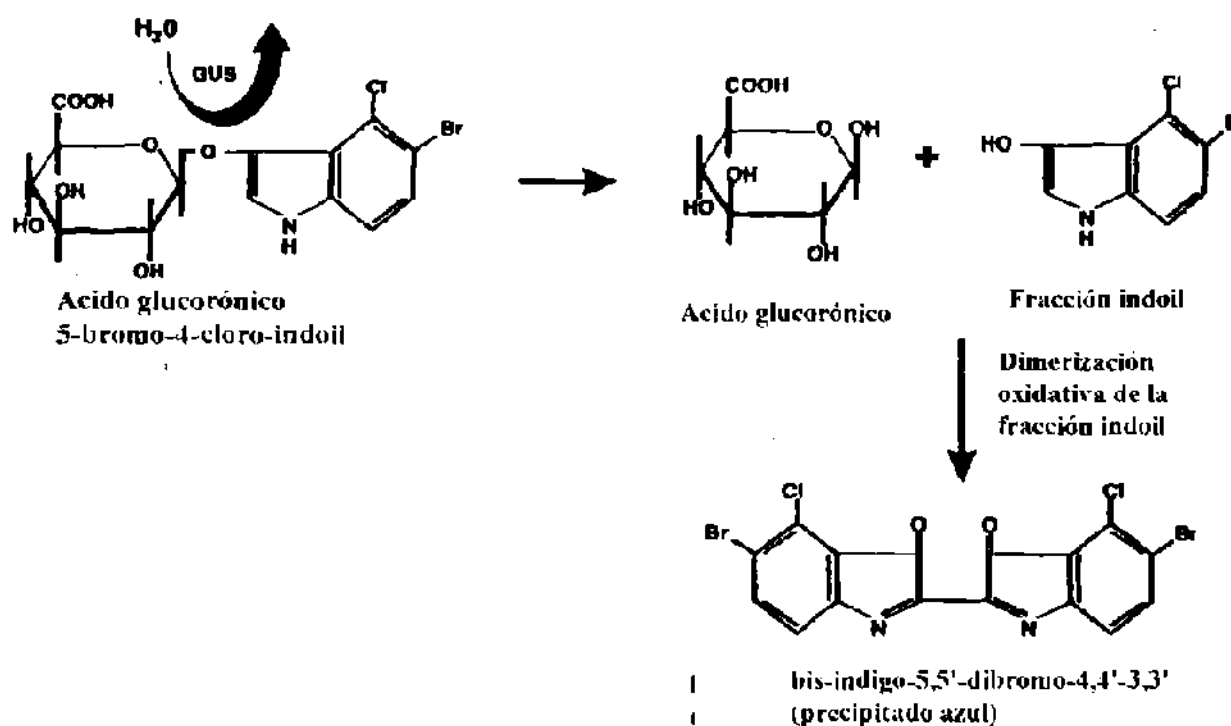


Figura 1 Ruptura de GUS al X-glucA para generar un derivado indol, el cual espontáneamente dimeriza para formar un precipitado azul. (Tomada de Wilson, 1995).

Tabla 4. Genes marcadores disponibles de uso potencial en la ecología de *Rhizobium* sp.*

GENES	PRODUCTO	HIDROLISIS
<i>gusA</i>	β -Glucuronidasa	hidrólisis de una variedad de sustratos glucuronidos que genere productos de color o fluorescentes
<i>lucZ</i>	β -galactosidasa	hidrólisis de una variedad de sustratos glucuronidos que genere productos de color o fluorescentes
<i>phoA</i>	Fosfatasa alcalina	Hidrolisa una variedad de sustratos fosfatados para que genere productos de color
<i>xyIE</i>	Catecol-2-3 dioxigenasa	Convierte catecoles (incolores) a 2-hidroximuconico semialdehido (amarillo brillante)
<i>tfdA</i>	2,4, diclorofenociacétato	Convierte fenoxiacetato a fenol
<i>luxAB, luc</i>	Luciferasa	la actividad luciferasa lleva a la producción de luz y requiere de una larga cadena de aldehidos como sustrato y O ₂ y una fuente de equivalente reductor

* Adaptada de Wilson. 1995.

MATERIALES Y METODOS.

I. Material Vegetal. Las variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) empleadas para ensayos preliminares de invernadero fueron: Canario-101, Puebla-152, Flor de Mayo Bajío (FMB), Flor de Mayo-M-38 (FM-M-38), Bayo Victoria, Pinto Villa, Negro Criollo, Wisconsin-21-58 y N-3-117, para los experimentos de campo: zona templada húmeda (Guanajuato): Canario-101, FMB, Criollo (alubia), CIAT-333 y zona templada semiárida (Durango): Pinto Villa, Bayo Victoria, Negro Querétaro y Río Grande. Así mismo, se emplearon como cultivo buen fijador de nitrógeno a FM-M-38 (Acosta-gallegos *et al.* 1995) adecuada para las condiciones de riego y de buen temporal y como pobre fijador, la línea N-3-117 estimados por técnicas isotópicas de ^{15}N (Castellanos-Ramos comunicación personal).

Las pruebas isotópicas para determinar la fijación de nitrógeno, se realizaron de acuerdo a lo reportado por Hardarson (1985). En el presente estudio, se empleó como cultivo de referencia (CR), una gramínea: Cebada cultivar "Chihuahua", la cual se utiliza en condiciones de temporal y con un ciclo de cultivo similar al de frijol. Así mismo, se utilizó la línea experimental de frijol no nodulante Nod-125 (Davis *et al.* 1988), obtenida por mutación química del cultivar "RIZ-30". Las semillas de frijol y cebada fueron obtenidas de los campos experimentales del INIFAP-Celaya y Durango.

II.-Ensayos de Invernadero. Se sembraron los nueve genotipos de frijol en Jarras de Leonard modificadas, empleando suelo no estéril de Irapuato y recipientes de plástico con capacidad de 750 ml y solución libre de nitrógeno de Sadman con la siguiente composición: solución de hierro, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0 g; ácido cítrico 5.0 g; agua destilada 1000 ml; solución de micronutrientes compuesta por: (g/l) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.157; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.440; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.076; $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.020; H_3BO_3 2.26. Por cada 10 l de agua desionizada de solución se añaden: KCl 0.99 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.285 g; K_2HPO_4 2.32 g solución de hierro 3.33 ml, solución de micronutrientes 3.33 ml, KNO_3 0.421 g, CaSO_4 5.262 g. A los 42 días después de la siembra (dds), se cosechó la planta completa y se determinaron los parámetros de nodulación (número y peso), así como peso seco de la planta.

Experimentos de Campo con ^{15}N . Durante el ciclo Primavera-Verano de 1994, se establecieron cuatro experimentos de campo de frijol para dos zonas agroecológicas del país: Zona Templada Húmeda (Guanajuato) y Zona Templada Semiárida (Durango). Se seleccionaron dos sitios por zona, de acuerdo a la regionalización agroecológica de cada estado: óptima y marginales para el cultivo. Los sitios para Guanajuato fueron: Dolores Hidalgo (óptima) y San Diego De La Unión (marginal); Para Durango: Súchil (óptima) y Francisco I. Madero (marginal). Por ser zonas de cultivo de temporal, solamente fue posible obtener resultados de Dolores Hidalgo y Francisco I. Madero, debido a la escasez de lluvia. Las siembra se efectuaron el 12 de junio en Dolores Hidalgo y 18 de Junio en Fco. I. Madero, Dgo.

Los experimentos se fertilizaron con 10 kg N ha^{-1} en forma de sulfato de amonio en solución al momento de la siembra, conteniendo 10,075 % de átomos en exceso (a.e.) de ^{15}N y aplicado en franja de 1.5 m a lo largo del surco en todos los tratamientos. Asimismo se aplicó fósforo (60 kg ha^{-1}) en forma de superfosfato triple al momento de la siembra.

Los experimentos se diseñaron como bloques completamente azar con cuatro repeticiones. Cada tratamiento se sembró en un parcela experimental de $5 \times 0.76 \text{ m}$ y una distancia entre plantas de 10 cm, la cebada fue sembrada a chorrillo. La microparcela útil, constó de un surco 1.5 por 0.76 m. Para las determinaciones de rendimiento en grano y paja, se utilizaron dos surcos por tratamiento sembrados por separados en el mismo sitio experimental, se siguieron las prácticas de cultivo recomendadas para cada región.

La distribución de tratamientos se presentan en la fig. (2).

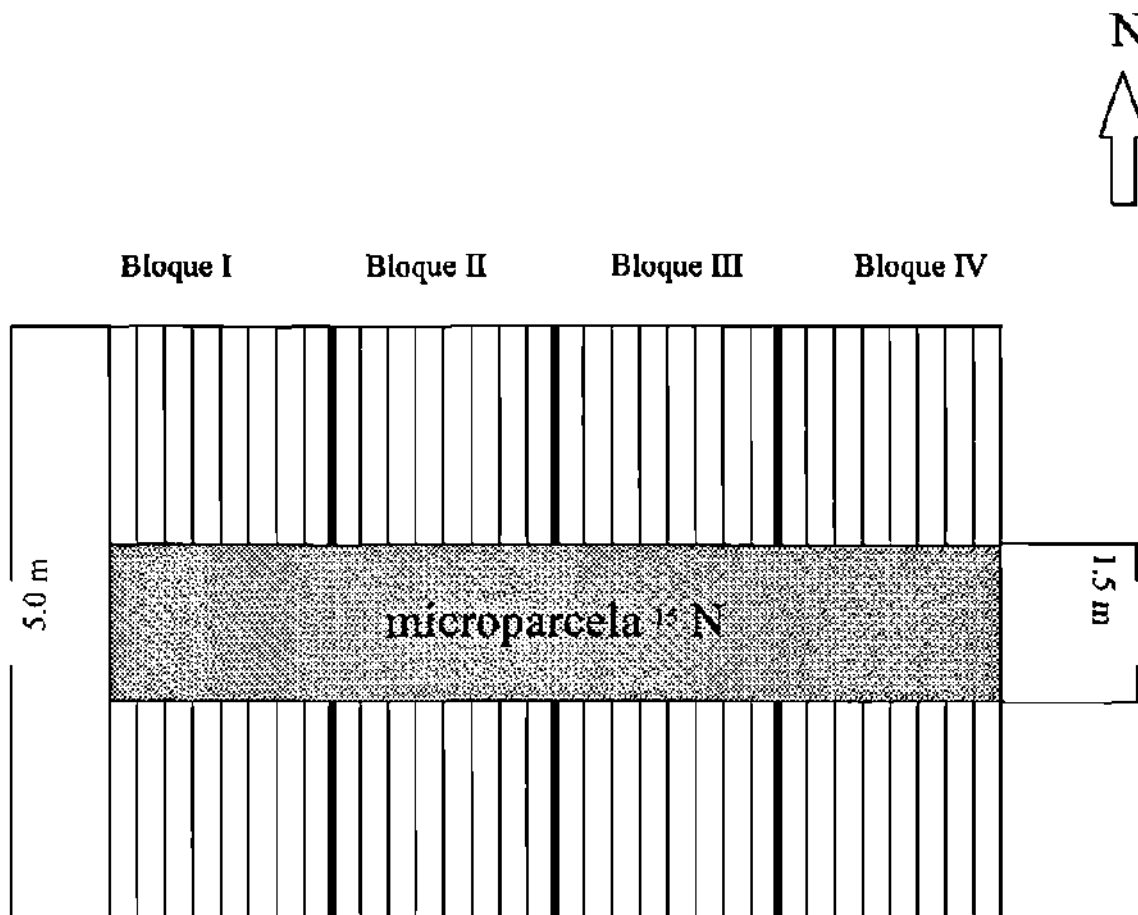


Figura 2. Croquis de distribución de tratamientos en campo.

Parámetros analizados.

- Nodulación (número y peso de nódulos).
- Caracterización de *Rhizobium* asociados a frijol:
 - a).- Definición de especie por ribotipificación y RFLP.
 - b).- Caracterización por resistencia intrínseca de antibióticos.
 - c).- REP y ERIC-PCR
 - d).- Multilocus de enzimas
 - e).- Perfiles de plásmidos por el método de Eckardt (1978)
 - f).- Patrón de proteínas totales por SDS-PAGE.
- Determinación de materia seca (grano y paja).
- Porcentaje de N total.
- Rendimiento de N.
 - Determinación de N fijado, mediante el método de dilución isotópica.

Porcentaje de N derivado del suelo (% Ndds)

- Porcentaje de N derivado del fertilizante (% Nddf).
- Actividad de reducción de acetileno, bajo condiciones de invernadero.

A continuación se da una descripción de las metodologías empleadas.

Nodulación. A los 50 días después de la siembra en la parcela experimental no marcada, se sacaron dos plantas completas por tratamiento y se determinó su número y peso. Los nódulos fueron preservados en un tubo conteniendo sulfato de calcio como desecante, para su posterior análisis microbiológico.

Aislamiento de cepas nativas. Del total de nódulos de cada tratamiento (dos plantas) se seleccionó al azar el 15 % del total de nódulos de tres genotipos: "Flor de Mayo-M-38"; "Negro Querétaro" (buenos fijadores) y la línea "N-3-117" (pobre fijadora). Los nódulos obtenidos, se esterilizaron superficialmente de acuerdo con la metodología propuesta por Somasegaran y Hoben (1985). Los aislados fueron purificados y con ellos se efectuaron las pruebas presuntivas para establecer que son *Rhizobium*, de acuerdo con lo propuesto por Martínez *et al.* (1991); Segovia *et al.* (1993) y Somasegaran y Hubel (1985). Estas consistieron en: observación morfológica mediante tinción Gram, crecimiento en medio mínimo suplementado con lactosa (MMlac), extracto levadura y peptona (PY) conteniendo el antibiótico de ácido nalidixico ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) incubados a 28°C y en agar Luria incubados a 37°C , prueba de β -lactamasa, utilizando como control positivo a la especie de *Agrobacterium tumefaciens*(PTI-C58) proporcionada por el Laboratorio de Ingeniería Genética de CINVESTAV Unidad Irapuato. Los aislados fueron mantenidos en tubos con ELMA a 4°C .

Patrones de Resistencia Intrínseca a Antibióticos. Cada uno del total de 59 aislados fueron crecidos en caldo extracto de levadura manitol e incubados en baño metabólico a 250 rpm durante 24 horas a 30°C . Se inocularon $100 \mu\text{l}$ del cultivo de toda la noche y se colocó un multidisco (con 12 sensidiscos. Sanofi Pasteur México) sobre la superficie seca de la caja petri inoculada por duplicado e incubadas a 28°C durante 24-72 h. Los antibióticos evaluados fueron: amikacina 30

$\mu\text{g ml}^{-1}$, ampicilina 10, cefalotina 30, ceftriaxona 30, cloranfenicol 30, dicloxacilina 1, enoxacina 10, eritromicina 15, gentamicina 10, netilmicina 30, trimetoprim-sulfametoxazol 25 y penicilina 10 U (unidades).

Aislamiento de DNA como templado para la técnica de PCR. Una asada de células rizobiales crecidas por 12 h se resuspendieron en 50 μl de TE pH 8.0 (Sambrook *et al.* 1989), en tubos eppendorf de 1.5 ml perforados de la tapa, se colocaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4-5 minutos y en seguida transferidos en hielo por un minuto, de nuevo, se colocaron en agua en ebullición por dos minutos, a continuación son colocados sobre hielo por un minuto y finalmente sobre agua en ebullición por 2 minutos. Las células se centrifugan a 12,000 rpm por dos minutos y el sobrenadante se transfirió en tubos eppendorf y almacenados a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Iniciadores REP y ERIC-PCR empleados. Se utilizaron como iniciadores aquellos descritos por De Bruijn (1992), (Tabla 3). El DNA fue amplificado empleando 2 μl de DNA como templado, colocado en un una solución bufer 1X (de una solución concentrada 10X, obtenida de la compañía Gibco). Tres mM de MgCl_2 , 200 μM (de cada uno) de dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 2 a 4 μM (si solamente se empleara solamente un iniciador) y 2 U de Taq DNA polimerasa (Gibco) en un volumen de reacción de 26 μl . Se utilizó un termociclador Perkin-Elmer (GeneAmp PCR System 9600), utilizando el siguiente perfil de temperaturas: una temperatura inicial de desnaturalización de $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un minuto, seguido de 30 ciclos de desnaturalización por 20 segundos a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, alineamiento por 30 segundos a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y extensión por 2 minutos a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una extensión final por 4 minutos a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. El volumen total de la reacción de amplificación, se corrió en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio ($0.5\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$). Se empleó como marcador de peso molecular, el DNA del fago λ digerido con las enzimas EcoRI y HindIII. El patrón de bandas generado por cada aislado fue comparado entre sí con el resto de los aislados (un total de 14 muestras se analizaron por gel). Aquellos aislados que presentaron el mismo patrón en geles diferentes, fueron comparados entre sí, corriendolos en un mismo gel y bajo las mismas condiciones de corrimiento. A los geles se les tomaron fotografía para fines comparativos.

Definición de especie de *Rhizobium* asociada(s) a frijol. Para la definición de especie de *Rhizobium*, se utilizó el procedimiento de tipificación ribosomal, descrito por Schmidt, (1994), Laguerre *et al.*, (1994). Los genes de la subunidad 16S fueron amplificados, utilizando, ocho μl de DNA como templado en el bufer 1X (de una solución concentrada 10 X Gibco), 3 mM de MgCl_2 , 200 μl (de cada uno) dDATP, dCTP, dGTP, dTTP; 2 μM de cada uno de los iniciadores rD1 y fD1 así como 2 U de Taq DNA polimerasa (Gibco) en un volumen de reacción de 100 μl . Se utilizó el mismo termociclador citado y el siguiente perfil de temperaturas: una desnaturalización inicial a 95 °C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos por 20 segundos a 94 °C, alineamiento por 30 segundos a 55 °C y extensión por 1 minuto a 72 °C con una extensión final de 4 minutos a 72 °C. Ocho μl del producto de la reacción fueron analizados en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Trece microlitros de el producto de reacción de amplificación fue digerido con las enzimas de restricción HaeIII, AluI, TaqI y MspI de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Gibco) en un volumen de reacción de 20 μl . El volumen total de reacción fue analizado en un gel de agarosa de 2.5 % teñido con bromuro de etidio. Los patrones de bandas generados por los diferentes aislados fueron comparados con cinco cepas rizobiales de referencia *R. leguminosarum* bv. viciae VF39, *R. etli*, *R. tropici* IIA (CFN-299) y IIB (CIAT-899), *R. meliloti* 2001.

Cepas de referencia de *Rhizobium*. Diferentes cepas de colección de *Rhizobium* como referencia fueron proporcionadas amablemente por la doctora Esperanza Martínez Romero del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la Universidad Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos México. Las cepas fueron: *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae VF39, *R. meliloti* 2001 y 41, *R. etli* CFN42 y *R. tropici* IIA (CFN-299) y IIB (CIAT-899), *R. trifolii* USDA-2159, *R. leguminosarum* bv. phaseoli (aislado de Inglaterra, sp18).

Preparación de lisados para MLEE. Cada uno de los 45 aislados fueron crecidos durante la noche en agitación continua a 250 rpm a 30 °C en matraces conteniendo 30 ml de medio PY, suplementado con 5.3 mM de cloruro de calcio. Las células fueron cosechadas por centrifugación a 6000 X g durante 10 min a 4 °C. La pastilla fue resuspendida en 300 μl de sulfato de magnesio

10 mM, se adicionó 50 µl de lisozima (1 mg ml⁻¹) y se mantiene a temperatura ambiente durante 10 min. Enseguida, se colocan a -70 °C por 15 minutos y de nuevo se dejan a temperatura ambiente por 5 min, nuevamente se colocaron a -70 °C por 15 min, se sacan y mantienen a 4 °C para su análisis. Se almacenan a -70 °C. La técnica de electroforesis en gel de almidón y tinción selectiva de enzimas aplicada al estudio de la genética de poblaciones y sistemática de bacterias ha sido descrita previamente por Selander *et al.*, (1986). Se estudiaron diez enzimas, solamente se consideraron siete para construcción de dendogramas. Los sistemas electroforéticos, buffer empleados y enzimas estudiadas fueron los siguientes: Tris citrato, pH 6.7 (6-fosfogluconato deshidrogenasa, NAD Malato deshidrogenasa), Tris citrato, pH 8.0 (Iasocitrato deshidrogenasa, Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa); Borato, pH 8.2 (Indofenol oxidasa, Fosfoglucomutasa); Tris acetato, pH 7.5 (D-L alanina deshidrogenasa) (Selander *et al.* 1986).

Las diferentes variantes de movilidad, denominadas electroformas o electrotipos (TE's) para cada enzima, se numeran en orden decreciente de acuerdo a la movilidad, siendo igualadas con los alelos de los correspondientes locus de genes estructurales y perfiles de electroformas para las siete enzimas. Los ET's fueron comparados con los multilocus de los genotipos. Se elaboró un dendograma, mediante la construcción de matrices de distancias, empleando el programa Unweighted Pair Group Method (UPGM) con medias aritméticas, proporcionado por el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la Universidad Autónoma de México, de Cuernavaca, Morelos.

Obtención de perfiles de plásmidos. Se seleccionaron cepas representativas de los grupos obtenidos por MLEE : Q4, Q5, Q7, Q15, Q16, Q19, Q22, Q24, F11, N10, N14, se incluyeron cepas obtenidas de CALI Colombia : CIAT-613, CIAT-632 y CIAT-CR-477B así como las cepas proporcionadas por Dra. Esperanza Martínez Romero : CIAT-899, CFN-299, CFN-42, Chag4 y CFN-299 aislada de nódulo. Se utilizó el procedimiento de Eckard (1978), modificado por Wheatcroft *et al.* (1990).

Determinación de perfiles de proteínas por Electroforesis en Geles de Poliacrilamida con Duodecil Sulfato de Sodio en Una dimensión (ID-SDS-PAGE). Se seleccionaron las cepas representativas de los principales grupos obtenidos por MLEE : Q5, Q15, Q16, Q24, F5, F8, F15,

N10 y N14 se incluyeron los aislados Europeos cb11 y cb14 así como las cepas de referencia :CIAT-899, CFN-299, CFN-42, *R. meliloti-41*, *R. trifolii*. Las determinaciones de patrón de bandas de proteínas totales de cada uno de los aislados, fueron realizadas de acuerdo con la metodología propuesta por Laemmli (1970). Cada uno de los aislados fue crecido en caldo PY hasta una densidad óptica de 0.9 (λ de 630 nm). Se tomó un ml de cada cepa y se centrifugó a 12,000 rpm en microcentrifuga (Eppendorf centrifuge 5415 C Brinkmann Instruments), se desecho el sobrenadante, la pastilla celular se resuspendió en 200 μ l de agua bidestilada estéril. Se adicionó 200 μ l de solución de muestra (Buffer Tris 1M pH 6.8; 0.31 ml , SDS 2.0 ml; Glicerol, 1.0 ml; 2- β -Mercaptoetanol 0.5 ml; agua bidestilada 1.34 ml). Calentar a ebullición en baño María por 5 min. Se prepararon los geles de policarilamida, de acuerdo con las especificaciones del fabricante y a una concentración del 10 % de la poliacrilamida. Se utilizaron como marcadores de peso molecular α -macroglobulinas (170 KDa), β -galactosidasa (116.4), Fructosa-6P-quinasa (85.2), glutamato deshidrogenasa (55.6), aldolasa (39.2), triosa fosfato isomerasa (26.6), Inhibidor de tripsina (20.1) obtenidos de Boehringer Mannheim Biochemical. Se corrió la electroforesis a 15 mA para el gel concentrador y a 20 mA para el separador, hasta que el colorante de referencia llegue al borde inferior del gel. Se tiñeron los geles por 20 minutos en azul de Coomassie, se eliminó la solución de tinción y se agrega la de destinción I (Metanol 100 ml, ác. acético 20 ml y agua bidestilada, 80 ml) hasta cubrir el gel, dejándose desteñir por 20 min en agitación suave. Se cambió la solución de destinción por destinción II (ácido acético 70 ml, metanol 50 ml, agua bidestilada 930 ml) dejando en agitación suave por 20 min. Se eliminó la solución y se dejó en agua durante 12 horas en agitación suave. Se colocaron los geles entre dos hojas de celofán y dejaron secar a temperatura ambiente.

Se elaboró una recta de regresión para la determinación de los pesos moleculares, mediante la migración relativa (M_r) de los marcadores de peso molecular empleados.

Actividad de Reducción de Acetileno. La técnica de reducción de acetileno (ARA), se utilizó como una medida indirecta de la actividad de la enzima nitrogenasa en las plantas de frijol noduladas bajo condiciones de invernadero, siguiendo lo propuesto por Dart *et al.*, (1972).

Se seleccionaron las cepas representativas de los principales grupos obtenidos por ERIC-PCR de los genotipos "Flor de Mayo-M-38", "Negro Querétaro" y "N-3-117"; las cuales fueron:

F3, F4, F11, Q14, Q17, Q21, N7, N11, y N13. La letra inicial corresponde a aislados obtenidos de los tres genotipos antes citados respectivamente. Semillas de cada uno de éstos fueron incubadas en agar agua al 1.0 % a 30 °C por 3-4 días. Se sembraron dos semillas por jarra de Leonar modificada, empleando recipientes de 750 ml, con arena estéril como sustrato y empleando una solución libre de nitrógeno de Sadman. Las cepas fueron incubada en CELM por 24 horas y cosechadas en su fase logarítmica de crecimiento. Se inocularon por triplicado cada tratamiento con 1.0 ml del inoculo.

A los 47 días después de la inoculación, se sacaron las plantas completas y se separó la raíz, se removió el suelo cuidadosamente tratando que las plantas conserven el total de sus nódulos. El sistema radical se separó de su parte aérea y se colocó en frascos de vidrio con capacidad de 660 cm³ (se colocó en el centro un septo de hule), sellando la tapa herméticamente con parafilm, del frasco se extrajo el 10 % de su volumen total, remplazándolo inmediatamente con el mismo volumen de acetileno.

Las muestras se incubaron por un periodo de una h a temperatura ambiente (28 °C). En seguida, el contenido de etileno generado por la reducción de acetileno se determinó al inyectar un ml de gas de la muestra en un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard serie 5800) acondicionado con una columna porapack N y de un detector de ionización de flama,, utilizando nitrógeno como gas acarreador.

Las condiciones del cromatógrafo fueron las siguientes:

- Horno a una temperatura de 100 °C.
- Detector e inyector a una temperatura de 120 °C.
- Flujos: N₂ 30 ml min⁻¹

H₂ 35 ml min⁻¹

Aire 450 ml min⁻¹

Para calcular la cantidad de etileno liberado en las muestras, se realizó una curva patrón de etileno, en las cuales se establecieron cantidades definidas de moles de éste gas para un área bajo la curva determinado. Para estimar el número de moles, se empleó la ecuación general de los gases:

$$PV = nRT$$

Donde: P = Presión en atmósferas.

V = Volumen en l

n = Número de moles.

R = Constante de los gases 0.082056 l atm °K⁻¹ mol⁻¹.

T = Temperatura en °K.

Estableciéndose la siguiente línea de regresión:

$$Y = y + b(x-x)$$

$$Y = .001x - 0.7$$

Teniendo una relación:

$$Y = bx, \text{ donde: } Y = \text{Area}$$

x = Número de moles.

b = Pendiente.

Los resultados se expresan como $\mu\text{Mol de C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$

Así mismo, se determinó el peso seco del follaje y de nódulos (mg).

Marcaje de cepas de *Rhizobium* con el gen Gus. Paralelamente a los estudios de biología molecular, se llevaron a cabo experimentos para la obtención de cepas marcadas con el gen GUS, de acuerdo con el portocolo desarrollado por la Dra. Angela Sessitsch de la IAEA\FAO, 1995.

Determinación de Materia Seca. El material vegetal se cosechó de un área de 0.72 m² de la parte del bloque marcado isotópicamente. Las plantas de frijol se dividieron en grano y paja. este material se colocó en bolsas de papel y se secaron en horno (Modelo HSCF, serie HSCHME) a 70 °C por un periodo de 48 h. Posteriormente, las muestras se pesaron y molieron en un molino (Thomas Willey Mill Lab) que contenía una malla con poro de un mm de diámetro, estas se almacenaron para su análisis posterior.

Rendimiento de Nitrógeno. Este parámetro se determinó multiplicando el rendimiento de materia seca por el porcentaje de nitrógeno en la planta determinado por el método Kjeldahl.

Determinación del nitrógeno fijado por el método de dilución isotópica. El grado en el cual el ^{15}N es detectado en la planta, provee una estimación de la proporción de N de la planta derivado de la fijación, se considera un método directo de cuantificar el nitrógeno fijado.

Este método involucra el crecimiento de plantas no fijadoras de nitrógeno (CR) en suelos enriquecidos con fertilizantes que contienen ^{15}N y se basa en la dilución diferencial entre el ^{15}N y el nitrógeno fijado por la planta

La determinación del nitrógeno fijado se basa en que el N del cultivo de referencia solo puede provenir del fertilizante y del N del suelo, mientras que para el cultivo fijador de N_2 , éste puede provenir del fertilizante, del suelo y de la atmósfera a través de la fijación.

Los valores que se deben medir y las fórmulas empleadas para determinar los porcentajes de n derivado de la atmósfera (% Ndda), derivado del fertilizante (% Nddf) y derivado del suelo (% Ndds) son las siguientes:

1.- Materia seca de paja y grano en kg ha^{-1} :

$$\text{M.S.} = [\text{M.S. (g m}^{-2}\text{) por parcela útil X } 10,000 \text{ (m}^2 \text{ ha}^{-1}\text{)}] / 1000 \text{ (g)}.$$

2.- Porcentaje de N en paja y grano .

3.- Porcentaje de ^{15}N a.e. en paja y grano, así como el contenido de N del fertilizante.

4.- Rendimiento de N (kg ha^{-1}) de paja y grano:

$$\text{R. N} = [\text{M.S. de la parte de la planta X \% de N total}] / 100.$$

5.- % N derivado del fertilizante

$$\% \text{ Nddf} = [\% \text{ }^{15}\text{N a.e. de la muestra de la planta} / \% \text{ }^{15}\text{N a.e. del fertilizante}] \times 100.$$

6.- Rendimiento de N del fertilizante (Kg ha⁻¹):

$$R. N \text{ del F.} = R. N (\text{kg ha}^{-1}) \times \% \text{ Nddf.}$$

7.- Promedio del % Nddf para la planta completa:

$$\% \text{Nddf (P.P.)} = [(R. N \text{ del F partes de la planta}) / (R. N \text{ partes de la planta})] \times 100.$$

8.- Porcentaje de N derivado de la atmósfera.

$$\% \text{ Ndda} = [1 - (\% \text{ Nddf cultivo fijador} / \% \text{ Nddf cultivo no fijador})] \times 100.$$

9.- Nitrógeno fijado (kg ha⁻¹):

$$N_2 \text{ fijado} = [\% \text{ Ndda} \times \text{Total de N en el cultivo fijador}] / 100.$$

$$10.- \% \text{ Ndda} = [1 - (\% \text{ }^{15}\text{N a.e. cultivo fijador} / \% \text{ }^{15}\text{N a.e. cultivo no fijador})] \times 100.$$

$$\% \text{ Ndda} = [1 - (\% \text{ }^{15}\text{N ddf cultivo fijador} / \% \text{ }^{15}\text{N ddf cultivo no fijador})] \times 100.$$

El % ¹⁵N a.e. en las distintas partes de la planta fue determinado por medio de un espectómetro de emisión NOI-6e. Aquí, se asume que la proporción de nitrógeno disponible del suelo y del fertilizante es la misma para el cultivo fijador y no fijador, además de que deben tener perfiles similares de toma de nutrimentos, especialmente en la toma de nitrógeno (Hardarson, 1985).

Análisis estadístico. Una vez concluido el trabajo experimental, se organizaron los datos obtenidos de los distintos parámetros evaluados y se procedió a su análisis estadístico. A los resultados obtenidos se les aplicó, análisis de varianza, de acuerdo al diseño experimental de bloques completamente al azar, comparación de medias cuando existieron diferencias estadísticas significativas; así como análisis de regresión lineal cuando se realizaron curvas patrón y correlación de las diferentes variables involucradas en el proceso de fijación de nitrógeno.

RESULTADOS

ENSAYO DE INVERNADERO

El objetivo de los estudios en invernadero, fue evaluar la capacidad de nodulación de las cepas nativas de *Rhizobium* sp. en respuesta a diferentes genotipos de frijol. Los resultados obtenidos para el número y peso seco de nódulos (promedio de dos plantas por tratamiento), mostraron la existencia de diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (genotipos), destacando, para peso seco de nódulos, los genotipos "Canario-101" y "Puebla-152" y el promedio más bajo correspondió al "Negro Criollo". Para la variable del número de nódulos, nuevamente los mejores promedios correspondieron a los genotipos "Canario-101" y "Puebla-152", mientras que los genotipos "N-3-117" y "Wisconsin" presentaron los valores más bajos (Tabla 5).

Tabla 5. Respuesta a la nodulación por cepas nativas de *Rhizobium* sp. en nueve genotipos de frijol bajo condiciones de invernadero 42 días después de la siembra.

GENOTIPOS	Peso Seco de Nódulos (mg) ¹	Peso Específico de Nódulo (mg)	Número de Nódulos ¹	Peso Seco del Follaje (g) ¹
Canario-101	410a	1.0a	402a	2.9a
Puebla-152	290b	0.97a	294b	2.6a
Pinto Villa	260c	1.75a	150d	3.1a
FM-M-38	250c	1.25a	200c	2.0a
FMB	220c	1.07a	218c	2.3a
N-3-117	220c	1.93a	114e	2.5a
Bayo Victoria	190d	0.97a	194c	1.7a
Wisconsin	190d	1.67a	114e	1.7a
Negro Criollo	120e	1.05a	118e	1.4a
PROMEDIO	239	1.30	200	2.15

¹ = Promedio de dos plantas.

Los valores seguidos de las mismas letras no difieren estadísticamente. Tuckey ($\alpha = 0.05$).

Sin embargo, en este caso, la nodulación no tuvo efecto sobre el peso del follaje, dado que el genotipo "Pinto Villa", presentó el mejor promedio, mientras que el más bajo fue para "Negro Criollo".

Experimentos de campo con ^{15}N .

El propósito del experimento fue medir la capacidad de fijación de nitrógeno de las cepas nativas de *Rhizobium* sp. asociadas a diferentes genotipos de frijol, bajo condiciones de temporal.

En los experimentos de campo en Francisco I. Madero, Dgo., encontramos nodulación efectiva, (nódulos color rosa), donde los valores mas altos se encontraron en los genotipos "Rio Grande" y "Pinto Villa" con 250 y 201 nódulos, respectivamente. Cabe señalar que los genotipos caracterizados como buen fijador ("FM-M-38") y pobre fijador ("N-3-117") presentaron valores de 104 y 96 respectivamente, siendo diferentes estadísticamente en comparación con los demás (Tabla 6).

Tabla 6. Respuesta a la nodulación por cepas nativas de *Rhizobium* sp. en diferentes genotipos de frijol cultivados bajo condiciones de temporal en Francisco I. Madero, Dgo.

GENOTIPOS	No. de Nódulos dos plantas ⁻¹	Peso Seco de Nódulos (mg)
RioGrande	251a	261a
Pinto Villa	202b	223a
Negro Querétaro	163b	253a
Bayo Victoria	123e	248a
FM-M-38	105e	131c
N-3-117	96e	210b
PROMEDIOS	157	221

Los valores seguidos de las mismas letras, no difieren estadísticamente Tuckey ($\alpha = 0.05$).

En cuanto al peso seco de los nódulos, los genotipos "Rio grande" y "Negro Querétaro", presentaron los valores mas altos (261 y 253 mg respectivamente), mientras que los más bajos correspondieron a "FM-M-38" y "N-3-117". Cabe destacar que el genotipo "N-3-117" aún y cuando fue el mas pobre en número de nódulos, éstos presentaron el mayor peso, indicativo de nódulos más grandes (Tabla 6).

Por otra parte, los resultados de campo realizados en Dolores Hidalgo, Gto. demostraron que la capacidad de nodulación fue muy reducida e ineficiente (nódulos pequeños, < 2mm de diámetro y de color blanco); por tanto, la determinación del peso seco fue innecesaria, así como

para los estudios de la caracterización de la población rhizobial asociada a los diferentes genotipos.

Determinación de materia seca.

Para el experimento de campo de Francisco I. Madero, Dgo., los resultados de rendimiento en paja y grano, no presentaron diferencias significativas. A pesar de ello, para la producción en grano, destacaron los genotipos "Pinto Villa" y "Río Grande" con 516 y 506 Kg ha⁻¹ respectivamente y, nuevamente, el menor valor correspondió al genotipo "N-3-117" con 432 Kg ha⁻¹. Los mejores rendimientos en paja correspondieron para "FM-M-38" y "Negro Querétaro" con 1306 y 1183 kg ha⁻¹ respectivamente, mientras que el valor más bajo fue para "Pinto Villa" con 763 (Tabla 7).

Tabla 7. Rendimiento de paja y grano en seis genotipos de frijol cultivados en temporal en Francisco I. Madero, Dgo.

GENOTIPOS	PAJA	GRANO
	kg ha ⁻¹	
FM-M-38	1,306ns	472ns
N-3-117	1,188	435
Negro Querétaro	1,183	535
Río Grande	1,111	506
Bayo Victoria	1,022	440
Pinto Villa	763	516
PROMEDIO	1,128	483

NS= No significativas

Para el caso del experimento en Dolores Hidalgo, Gto., se encontraron diferencias estadísticamente significativas. En la producción de paja, los mejores valores correspondieron a los genotipos "Criollo" y "FM-M-38" y el promedio más bajo lo presentó "Flor de Mayo Bajío" (FMB). Para el caso de grano, los genotipos "FM-M-38" y "FMB" presentaron la más alta producción. El promedio más bajo fue para el genotipo "CIAT-333" (Tabla 8).

Tabla 8. Rendimiento de paja y grano en seis genotipos de frijol sembrados bajo condiciones de temporal en Dolores Hidalgo, Gto.

	PAJA	GRANO
GENOTIPOS	kg ha⁻¹	
Criollo (alubia)	981a	323d
FM-M-38	950a	810a
N-3-117	694b	399c
Canario-101	560c	414c
CIAT-333	479d	281e
Nod-125	462d	283e
Flor de Mayo Bajío	403e	602b
Promedio	647	445

Prueba estadística igual que la Tabla 5.

Contenido de N total.

Los resultados de contenido de N total en frijol, tanto en paja como grano indican que para el experimento de campo en Fco. I. Madero, Dgo., los promedios fueron diferentes significativamente entre los genotipos ($P=0.01$), donde los mejores valores en paja, correspondieron a "Negro Querétaro" y "Rio Grande", por el contrario el genotipo que presentó el valor más bajo fue "N-3-117". Así mismo, para el contenido de N en grano, existieron diferencias entre tratamientos ($P=0.001$). Los mejores valores lo presentaron "Negro Querétaro" y "FM-M-38" con 4.9 %, mientras que el genotipo "Pinto Villa", presentó el valor más bajo con 4.3 % (Tabla 9). Para el caso de Dolores Hidalgo, los resultados indican que los genotipos fueron diferentes significativamente para esta característica, tanto en paja como en grano, los valores superiores los presentaron los genotipos "CIAT-333" y "Criollo", mientras que el valor más bajo lo fue para el genotipo "Flor de Mayo Bajío". Respecto al contenido de N en grano, los valores superiores fueron para los genotipos "CIAT-333" y "N-3-117" y el valor inferior le correspondió al cultivar "Flor de Mayo Bajío" (Tabla 10).

Tabla 9. Contenido de N total en paja y grano en seis genotipos de frijol cultivado bajo condiciones de temporal, en Francisco I. Madero, Dgo.

	PAJA	GRANO
GENOTIPOS	% de N total	
Negro Querétaro	2.0 a	4.9a
Rio Grande	1.8ab	4.5a
Bayo Victoria	1.7ab	4.4a
Nod-125	1.7ab	4.5a
Pinto Villa	1.6ab	4.3a
N-3-117	1.6ab	4.5a
FM-M-38	1.4b	4.9a
PROMEDIO	1.68	4.57

Los valores seguidos de las mismas letras, no difieren estadísticamente Tuckey ($\alpha = 0.05$).

Tabla 10. Contenido de N total de seis genotipos de frijol cultivado bajo condiciones de temporal en Dolores Hidalgo, Gto.

	PAJA	GRANO
GENOTIPOS	% de N total	
CIAT-333	4.07a	7.09ab
Criollo (alubia)	3.96a	6.43bc
Nod-125	3.65ab	7.28a
N-3-117	3.27abc	7.09ab
FM-M-38	3.07abc	6.69abc
Canario-101	2.45cd	6.61bc
Flor de Mayo Bajío	1.74d	6.23c
PROMEDIO	3.17	6.77

Los valores seguidos de las mismas letras, no difieren estadísticamente Tuckey ($\alpha = 0.05$).

Fijación de nitrógeno.

Porcentajes de nitrógeno fijado. Dado que las diferencias estadísticas entre tratamientos (Genotipos) no fueron significativas, solamente se señalan las tendencias observadas. Es importante destacar que el cultivo de Cebada (variedad Chihuahua), fue empleada como cultivo de referencia para establecer los cálculos correspondientes.

En la Tabla 11, se presentan los porcentajes de nitrógeno que provienen de la atmósfera, tanto para paja como grano para frijol sembrado bajo condiciones de temporal en Durango. El genotipo "Río Grande" fue el mejor fijador en paja, mientras que los genotipos: "FM-M-38" y "N-3-117", presentaron los promedios más bajos. Para el caso de grano, de nueva cuenta el genotipo "Bayo Victoria", resultó el mejor fijador, mientras que "N-3-117" fue el más bajo. Como se pudo, observar los valores fueron consistentes y cabe señalar que el genotipo "FM-M-38", que es reconocido como buen fijador bajo las condiciones previamente descritas, se comportó como un pobre fijador.

Tabla 11. Nitrógeno derivado de la atmósfera por cepas de *Rhizobium* sp. en seis genotipos de frijol sembrados bajo condiciones de temporal en Fco. I. Madero, Dgo.

GENOTIPO	PAJA	GRANO	PLANTA
	% Ndda		
Río Grande	48ns	41ns	46ns
Pinto Villa	36	24	32
Negro Querétaro	30	21	27
Bayo Victoria	29	22	25
N-3-117	22	14	20
FM-M-38	19	16	19
PROMEDIOS	21	23	28

NS= No significativo

Rendimiento de nitrógeno.

En cuanto a los resultados de los rendimientos de nitrógeno, así como la producción de grano (kg ha^{-1}), el mejor promedio correspondió a "Negro Querétaro", mientras que el más bajo lo fue para "Pinto Villa". Para el caso de grano, el mejor promedio fue para "Negro Querétaro" y el más bajo para el genotipo pobre fijador "N-3-117" (Tabla 12).

Tabla 12. Rendimiento de N en grano y producción de grano de seis genotipos de frijol cultivados de temporal en Francisco I. Madero, Dgo.

GENOTIPO	GRANO (kg ha^{-1})	
	RENDIMIENTO DE N	RENDIMIENTO
Negro Querétaro	23ns	535ns
Río Grande	21	506
N-3-117	20	435
FM-M-38	19	472
Bayo Victoria	18	440
Pinto Villa	17	516
PROMEDIO	20	484

NS= No significativo

II. Caracterización de los aislados.

a).- Ribotipificación por PCR-RFLP's. Los resultados obtenidos por esta metodología, indicaron que la mayoría de las cepas de *Rhizobium* asociadas a tres genotipos de frijol, pertenecen a *R. etli*, tal es el caso para el genotipo "FM-M-38", mientras que en "Negro Querétaro", un aislado resultó ser *R. tropici* IIa, característico de la cepa de referencia CFN-299. Así mismo, solamente un aislado no fue definido a nivel de especie (Tabla 13).

Tabla 13. Especies de *Rhizobium* asociadas a frijol, mediante el análisis de PCR-RFLP del gen de la subunidad 16S RNAr.

GENOTIPO	No. de aislados	<i>R. etli</i>	<i>R. tropici</i>	ND.
Negro Querétaro	24	21	1	2
FM-M-38	15	14	0	1
N-3-117	14	8	0	6

ND = No determinadas

b). **Caracterización por RIA** Las cepas nativas de *Rhizobium* mostraron gran variabilidad en los patrones de resistencia a los antibióticos probados. De esta manera, se obtuvo un total de 40 patrones diferentes, donde los aislados a partir del genotipo "Negro Querétaro" mostraron alta variabilidad con 16, mientras que el genotipo "N-3-117" presentó solo 11. Los valores obtenidos no difieren significativamente de un genotipo a otro (Tabla 14). Pero, cuando se analizaron los patrones de RIA comunes, destacaron tres de ellos (Tabla 15). Una característica importante en la resistencia a antibióticos fue que la mayoría de los aislados fueron resistentes a la penicilina (10 U) y sensibles a ceftriaxona (30 µg) y amikacina (30 µg).

Tabla 14. Caracterización por resistencia intrínseca a antibióticos de aislados de *Rhizobium* obtenidos de tres genotipos de frijol sembrados bajo temporal en Durango.

GENOTIPOS	No. DE AISLADOS	PATRONES	PORCENTAJE
Negro Querétaro	26	16	40
FM-M-38	18	13	33
N-3-117	15	11	27

Tabla 15. Patrones en común de RIA para los tres genotipos de frijol en estudio.

PATRONES	No. DE AISLADOS	PORCENTAJE
RIA-I	12	20
RIA-II	7	12
RIA-III	3	5

37

c). **Caracterización por ERIC-PCR.** En la Tabla 16, se presentan los diferentes patrones obtenidos por ERIC-PCR, para los tres genotipos de frijol estudiados. De nueva cuenta, el genotipo "Negro Querétaro" presentó el mayor número de patrones, mientras que FM-M-38, fue el más bajo. Al igual que para RIA, no se observan diferencias significativas entre los genotipos. Cabe destacar que se redujo el número de patrones (33) respecto a los obtenidos por RIA (40), dado que cada patrón de ERIC, presentó un mayor número de aislados. Por otra parte, no se encontró patrones en común para los tres genotipos, a diferencia de los que se encontró por RIA.

Tabla 16. Caracterización por ERIC-PCR de aislados de *Rhizobium* obtenidos de tres genotipos de frijol de temporal en Durango.

GENOTIPOS	PATRONES	PORCENTAJE
Negro Querétaro	13	41
FM-M-38	9	25
N-3-117	11	34

c). **Movilidad electroforética de enzimas (MLEE).** Un total de 48 aislados fueron estudiados, se incluyeron tres cepas de referencia Bra-5, CFN-299 y CFN-42. Los aislados fueron agrupados en ocho electrotipos (ET's), donde sobresale el ET-1, en el cual se incluye a un total de 38 aislados (tanto obtenidos de Q, F ó N) obtenidos de los tres genotipos de frijol de estudio, así mismo, en dicho grupo se incluye a la cepa de referencia de *Rhizobium etli* CFN-42. Se observó que aislados obtenidos del genotipo "Negro Querétaro", se encontró representado en seis de los ocho electrotipos (Tabla 17).

Tabla 17. Caracterización de 48 aislados de *Rhizobium* obtenidos a partir de tres genotipos de frijol sembrados bajo condiciones de temporal en Fco. I. Madero, Dgo.

ELECTROTIPOS	AISLADOS	PORCENTAJE
ET-1	38* + CFN-42	84
ET-2	Q-14, N10	4
ET-3	Q15	2
ET-4	Q16	2
ET-5	Q19	2
ET-6	Q22	2
ET-7	N14	2
ET-8	F5	2

* Se incluyen al resto de aislados de F, N y Q.

A través de los resultados de movilidad electroforética, se generó un dendograma de las siete enzimas evaluadas, en los cuales se incluyen los diferentes electrotipos. Se puede observar en términos de distancias genética que, con excepción del ET en el cual se incluye F5, los diferentes ET, presentan una reducida distancia entre un grupo y otro, lo cual indica una estrecha relación genética entre los aislados (Figura 3). Con los valores de distancia genética, se calculó la diversidad genética (H), bajo la siguiente ecuación:

$$h = (1 - \sum x_i^2) [n/n-1]$$

donde H es la media aritmética de h (diversidad genética por locus), x_i^2 es la frecuencia del iésimo alelo y n es el número de aislados. El valor de H resultó ser una de las más reducida (H=0.105) reportada, para la especie en estudio, *R. etli*.

De igual forma y de manera comparativa, se presenta el dendograma generado por la movilidad electroforética de cuatro enzimas, en el estudio que incluye a los aislados obtenidos en el Estado de Durango y en Viena, Austria (cepas proporcionadas por la Dra. Angela Sessitsch) en el cual se observa la separación de los diferentes aislados de acuerdo con su procedencia, Durango y Europa (clave cb), excepto en el caso del ET en el cual se incluyen a los aislados Q19 y Q22, el cual se mezcla con el grupo Europeo (Figura 4).

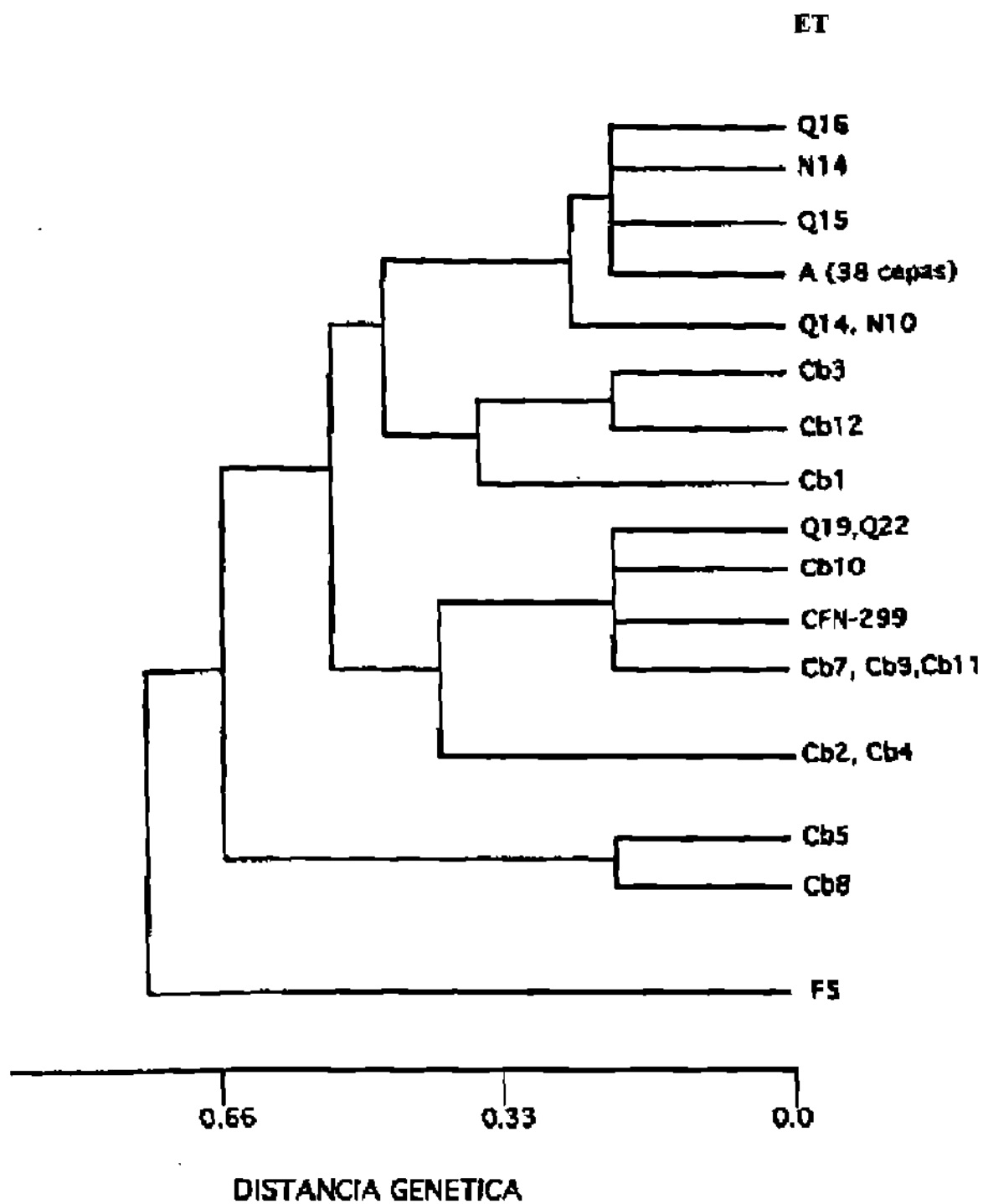


Figura 3. Dendrograma de aislados de *Rhizobium* obtenidos de tres genotipos de frijol, basandose en la movilidad electroforética.

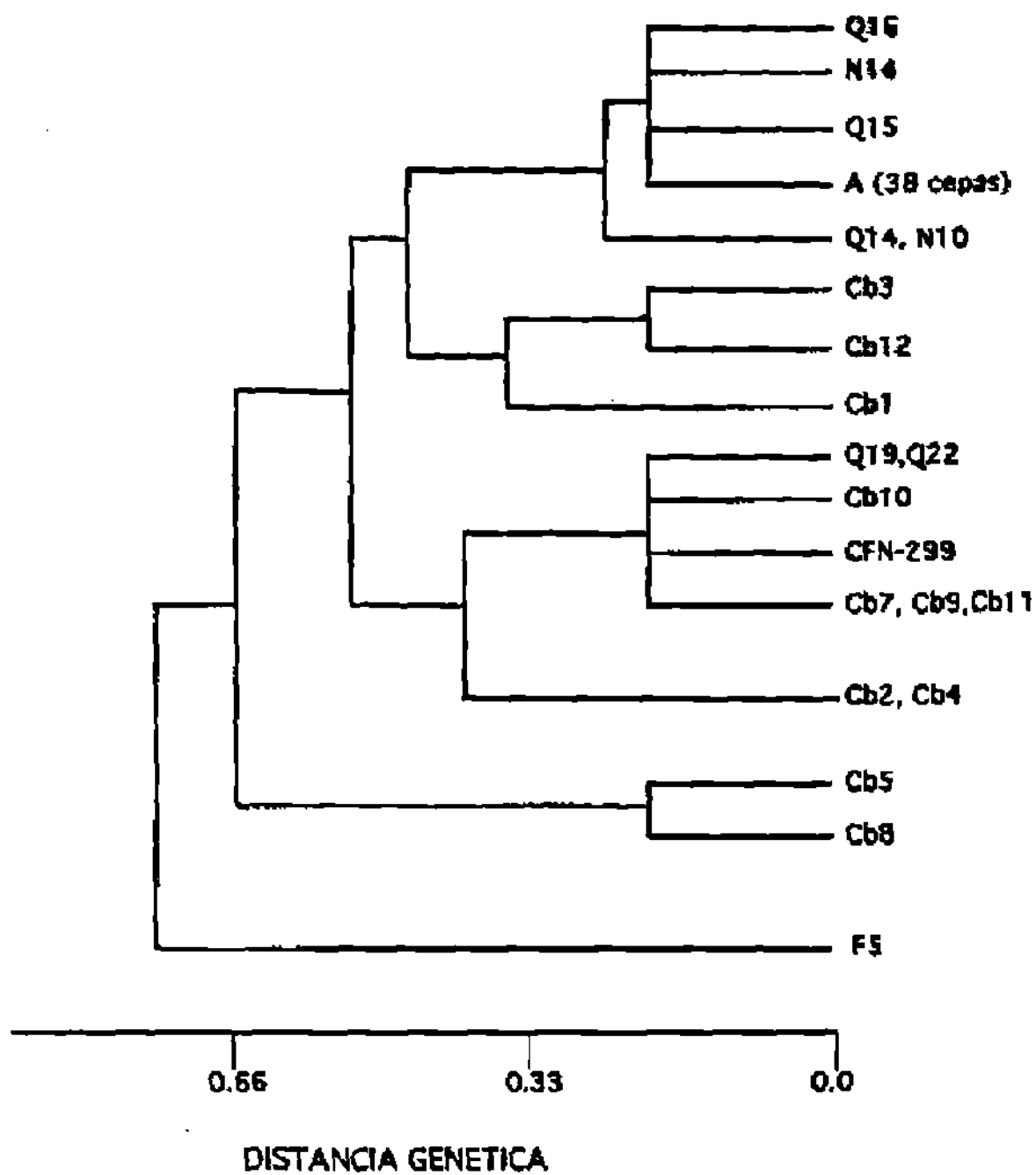


Figura 4. Dendrograma de aislados de *Rhizobium* que nodulan frijol obtenidos de Durango y Viena, Austria (clave cb).

e). Perfil de plásmidos.

En la figura 5, se presentan los perfiles de plásmidos de un grupo representativo de 10 cepas de *Rhizobium*, obtenidas de los genotipos en estudio. Como se pudo observar, existe una amplia variabilidad de patrones, dado que no se encontró patrón similar entre los 20 que fueron analizados, se incluyeron las cepas de referencia de *R. etli* (CFN-42), de *R. tropici* (CFN-299), así como cepas de referencia proporcionadas por el Centro de Investigación en Agricultura Tropical de Cali, Colombia.

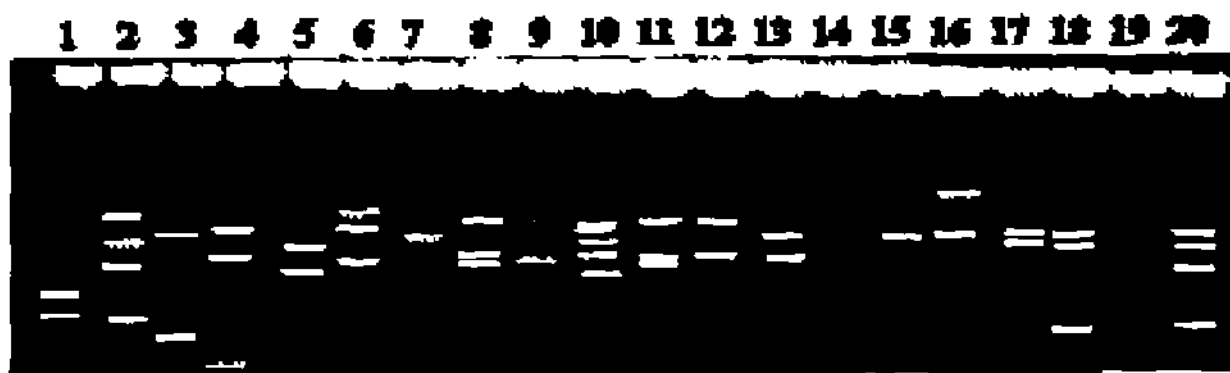


Figura 5. Perfil de plásmidos de diferentes cepas de *Rhizobium* asociadas a frijol. Carril 1, Q15; 2, Q16; 3, Q24; 4, N10; 5, F11; 6, CIAT-613; 7, CIAT-632; 8, CFN-299 tipo silvestre; 9, CIAT-CR-477B; 10, CFN-42; 11, CFN-299 reaislada de nódulo; 12, CIAT-899; 13, Chag 4; 14, Q4; 15, Q5; 16, Q7; 17, Q19; 18, Q22; 19, Q15; 20, Q16.

f). Perfiles de proteínas totales (ID-SDS-PAGE).

De las 16 diferentes cepas analizadas presentaron un total de 58 bandas diferentes, donde los intervalos de pesos moleculares oscilaron entre 17-135 kDa, lo cual indica la variabilidad tanto en número y pesos molecular de diversas bandas entre cada uno de los aislados; aún en aquellos caso como por ejemplo, Q5, F8, F15 y Q24, los cuales se consideran como un mismo electrotipo y por lo tanto representan un grupo genético definido.

g). Actividad reductora de acetileno.

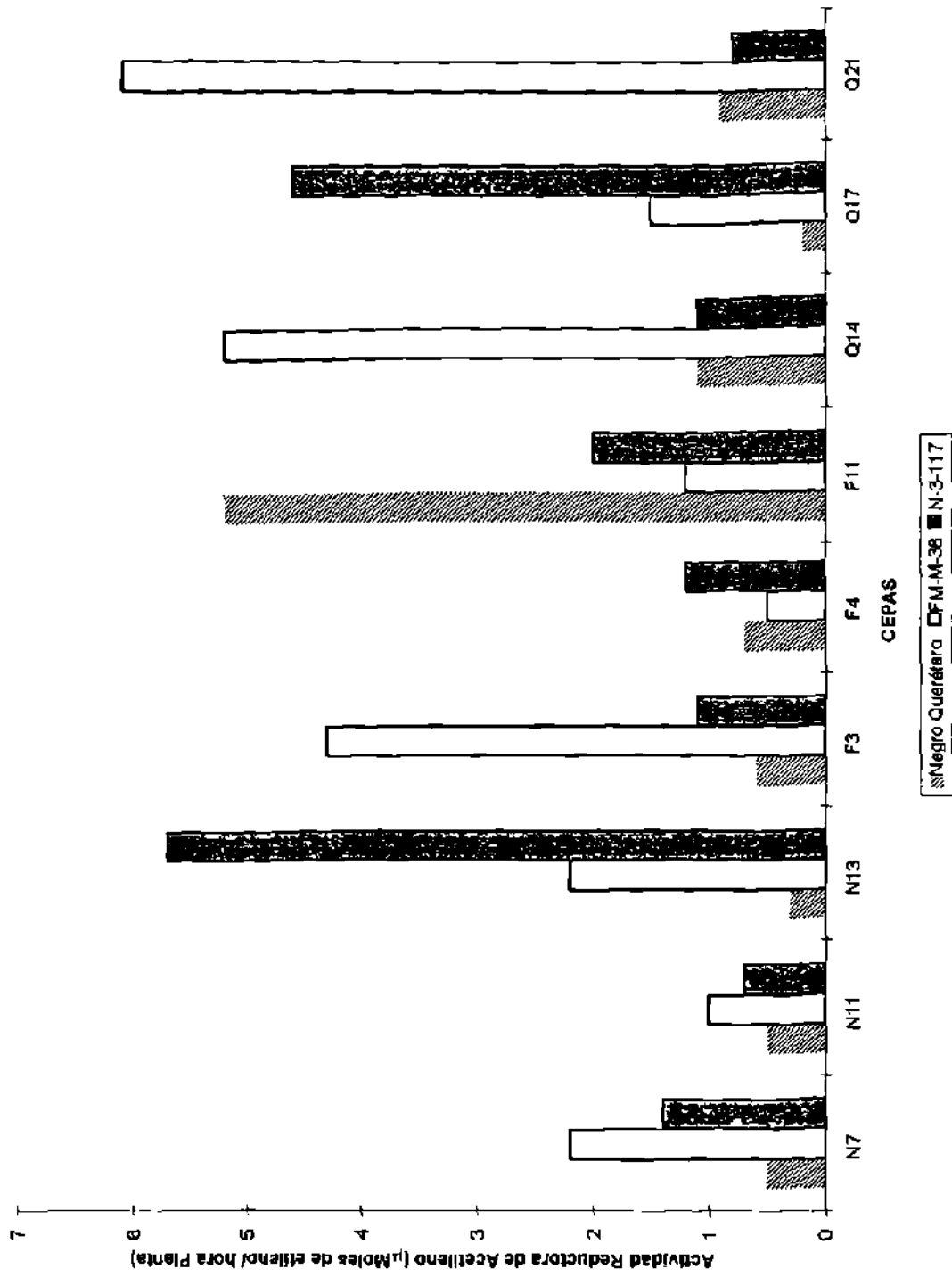
Estos ensayos fueron realizados en cepas representativas de cada grupo caracterizado por ERIC-PCR. Los resultados de actividad reductora de acetileno, indicaron diferencias altamente significativas entre tratamientos (cepas) y genotipos de frijol. Los valores de etileno producidos (μM de etileno planta⁻¹ h⁻¹), oscilaron de 0.4 a 6.0. El mejor cultivar lo fue "FM-M-38", siendo éste nodulado por la mayoría de las cepas, mientras que "N-3-117", fue intermedio y el más pobre fijador fue "Negro Querétaro". De igual forma, las cepas Q21 y Q14, fueron las mejores con el genotipo FM-M-38, N-3-117. Así mismo, la cepa Q17 lo fue para con el genotipo "N-3-117" y las cepas F11 y Q17 con "Negro Querétaro". Cabe señalarse, que la mayoría de las cepas no mostraron un efecto preferencial con el hospedero del cual originalmente estas fueron aisladas (Figura 6).

6.2.7. Competencia de cepas nativas de *Rhizobium*.

El propósito de los estudios de competencia fue determinar la capacidad de tres cepas nativas para la formación de nódulos cuando éstas se inoculan en una misma proporción. Para tal efecto, se inocularon las cepas nativas y una transconjugante con el gen GUS. Los resultados de estabilidad a la nodulación de cepas transconjugante de *Rhizobium* bajo condiciones controladas, mostraron que la cepa CIAT-899::*gusA*₁₀-B, fue estable y noduló de manera similar que la cepa paterna carente del gen GUS, tanto a 10 como a los 15 días después de la siembra. Cabe señalar que se obtuvieron transconjugantes de Q19 y CFN-42, así como de Oax-32, obteniéndose una mayor dificultad en el transconjugante de CFN-42 (Figura 7).

En la Tabla 18, se presentan los resultados de competencia en la formación de nódulos por las cepas nativas y el transconjugante CIAT-899::*gusA*₁₀-B. Diferencias significativas entre tratamientos (cepas nativas) fueron encontradas, empleando el cultivar "Negro Querétaro" como hospedero. Las cepas Q16 y Q19, sobresalen por su alta capacidad para competir y desplazar a la cepa introducida, mientras que Q21 fue una pobre competidora. Así mismo, el número de nódulos formados por la cepa Q21, se redujo de manera significativa en comparación con las buenas competidoras a pesar de haberse utilizado un alto nivel de inoculo.

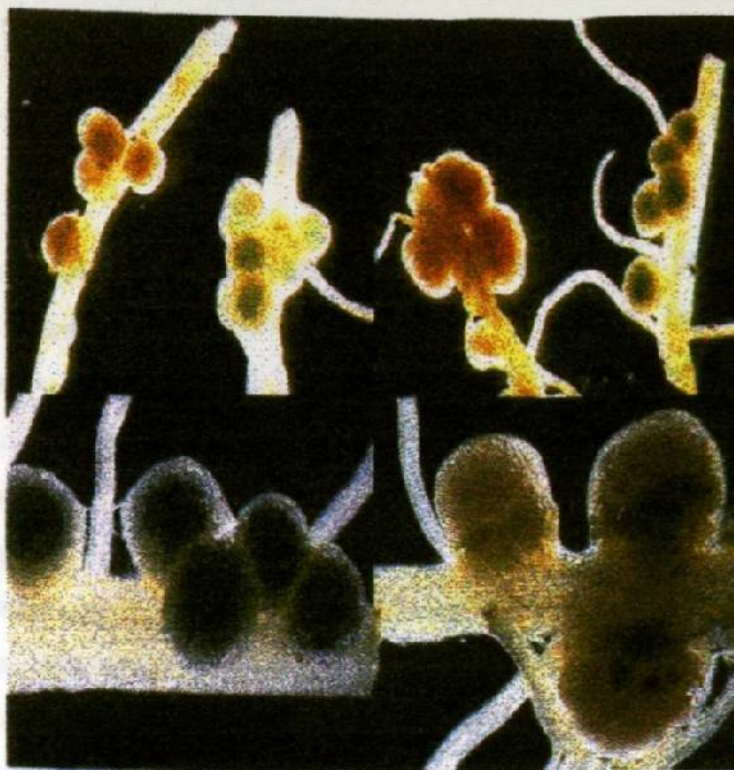
Figura 6. Actividad reductora de acetileno de nueve cepas de *Rhizobium* inoculadas a tres genotipos de frijol, Negro Querétaro, FM-M-38 y N-3-117.



PANEL A



PANEL B



PANEL C

Figura 7. Formación de nódulos a los 10 (Panel A) y 15 días después de la inoculación (Panel B) de la cepa transconjugante CIAT-899::*gusA*₁₀-B. El Panel C muestra la comparación de los nódulos formados por la transconjugante con y sin el gen *gus*.

Tabla 18. Número de nódulos formados en el cultivar "Negro Querétaro" en competencia para determinar la habilidad competitiva de tres cepas nativas contra la cepa transconjugante CIAT-899-*gusA*₁₀-B.

CEPAS	INOCULACION SIMPLE	INOCULACION EN MEZCLA 1:1 (No. de Nódulos)	
		CEPA NATIVA	CIAT-899 <i>gusA</i> ₁₀ -B
Q16	107a	96a	4a
Q19	108a	103a	7a
Q22	67b	24b	43b
CIAT-899 <i>gusA</i> ₁₀ -B	90a		

DISCUSIÓN

En nuestro país, el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es considerado la principal fuente de proteína para consumo humano. La superficie cultivada con esta leguminosa es de aproximadamente 2 millones de has., de las cuales el 85% se siembra bajo condiciones de temporal, hecho que repercute en la limitada producción de semilla. Los esfuerzos por incrementar la producción de grano, se han basado en la selección de genotipos de frijol adaptados a diversos ecosistemas agrícolas (capaces de fijar mayores cantidades de nitrógeno y tolerantes a sequía, principalmente) pero no existe un programa de mejoramiento con bacterias fijadoras de nitrógeno. En ese sentido, los estudios microbiológicos se han dirigido a la selección de cepas de *Rhizobium* altamente fijadoras de nitrógeno. Sin embargo, hasta el momento no se ha logrado el éxito esperado, debido, principalmente, a la carencia de estudios relacionados con la ecología de los simbioses. Un ejemplo de lo anterior está representado por las cepas nativas presentes en los suelos mexicanos, de las cuales se ha hipotetizado que compiten activamente con las cepas introducidas. A este respecto es poca la información generada en nuestro país, en virtud de las dificultades metodológicas que implican dichos estudios.

La información generada en este trabajo, contribuye al entendimiento del sistema *Rhizobium*-frijol desde una perspectiva agroecológica.

Nodulación. La nodulación es un fenómeno común entre los miembros de las leguminosas; sin embargo, este evento no se lleva al cabo en la todas las familias, demostrando que la nodulación y fijación de nitrógeno es un factor frecuente, pero no obligatorio (Obaton, 1983; Mellor, 1994). En este sentido, nuestros experimentos a nivel de invernadero y campo fueron conducidos bajo dos prenisas importantes: 1) utilizar genotipo de reconocida capacidad de fijación de nitrógeno, como lo son Puebla-152, FM-M-38 y Negro Querétaro -buenos- y malos fijadores como el genotipo N-3-117; y 2) el uso de genotipos comerciales adaptadas a las áreas de estudio. Los resultados obtenidos demuestran que existe una gran variabilidad de respuesta a la nodulación y que ésta no se reflejó en el rendimiento de biomasa (follaje) ni de grano. Este comportamiento se demostró para los genotipos Puebla 152 y Negro Criollo donde el primero presentó 290 nódulos contra 120 del segundo, pero el rendimiento de follaje fue estadísticamente igual con 2.6 g y 1.4 g,

respectivamente (Tabla 5-7). Estos resultados son muy semejantes a los obtenidos en trabajos previos donde se resalta la diferencia de nodulación entre diversos genotipos y que ésta no siempre va acompañada de mayor biomasa (Duques *et al.*, 1985; Hungria y Neves, 1986; 1987).

De acuerdo a nuestros resultados de respuesta a la nodulación bajo condiciones de campo, el genotipo "Negro Querétaro" reconocido como buen fijador (Hardarson *et al.*, 1993), presentó una mayor nodulación con respecto al pobre fijador "N-3-117", mientras que "Bayo Victoria" de desconocida capacidad de fijación, presentó la más alta nodulación y el mayor porcentaje de N derivado de la atmósfera (Tablas 6 y 11). Estos resultados concuerdan con las observaciones que los genotipos reconocidos como buenos fijadores, por ejemplo "Puebla-152" y "Riz-30" presentan una mayor nodulación en comparación a pobres fijadores, como "Salinaac" y "Rio Tibagi" (StClair *et al.* 1988; Muñoz *et al.* 1989; Pereira *et al.* 1989; Grageda-Cabrera, 1990). En cuanto a las características de los nódulos, las plantas con mayor cantidad de nódulos presentaron un menor peso específico. Estos resultados que concuerdan con lo reportado por Phia y Munns, (1987) para diferentes variedades de frijol, mientras que para soya se reporta lo contrario esto es, se requiere de un menor número de nódulos y por lo tanto de mayor peso para mejorar la FBN (Phia y Munns, 1984), de igual forma se han presentado casos similares para frijol (Duque *et al.*, 1985; Hungria y Neves, 1985; Tsai *et al.*, 1993). Los ensayos en campo han demostrado que la nodulación se reduce, aun y cuando los suelos presentan buenos niveles de humedad, lo que indica que no solamente el agua es un factor determinante de la nodulación (Tsaito *et al.*, 1984), y que, quizás, también estén involucrados otros factores bióticos y abióticos del suelo como el pH, arcillas, elementos químicos (nitrógeno, fósforo, azufre, etc.), materia orgánica, etc. (Graham, 1990). De esta manera, Pereira *et al.* (1993), señalan que aumento en el número de nódulos/planta es el resultado de cierta disponibilidad fisiológica-genética de la planta para presentar un mayor número de sitios a nodulación. Los componentes de la simbiosis y nodulación han sido obtenidos por genética clásica (StClair *et al.*, 1986, 1988; Pereira *et al.*, 1989; 1993).

La formación de nódulos fijadores de N requiere de un proceso continuo de dos vías, el reconocimiento celular y de señales entre el procariota y la planta. Tales procesos involucran la activación secuencial y/o represión de genes codificados por la planta y la bacteria (Michiels y Vanderleyden, 1994). Se ha propuesto, que el aumento en la nodulación y fijación de nitrógeno pueden ser una alternativa para incrementar los rendimientos con respecto a

leguminosas que son noduladas normalmente, como en el caso de soya. Sin embargo, los estudios con mutantes hipernodulantes (NOD4 y NOD1-3) no han resultado superiores agronómicamente con respecto a los cultivares comerciales "Williams-82" y "Habbit-87", lo que sugiere que posiblemente estos mutantes presentan una característica deletérea que reprime algún beneficio presente cuando se aumenta la nodulación (Prach *et al.* 1994). A pesar de que los valores obtenidos de nodulación, revelan diferencias entre los genotipos evaluados, esta variable no se vió reflejada en los rendimientos de biomasa y grano. Sin embargo, Pessanha *et al.* (1972), señalan que el efecto de la nodulación al no incrementar el rendimiento, pueda ser debido a un desequilibrio fisiológico, dado como un mecanismo común de resistencia del hospedero a la infección de sus raíces. Otra posible explicación podría ser que la limitación de agua influya en la disponibilidad de sitios para nodulación y peso específico de los nódulos, en la absorción de N (Saito *et al.*, 1984) y en el transporte de nutrimentos (Hungria y Franco, 1988; Padilla-Ramirez, 1989, Castellanos-Ramos, 1992; Peña-Cabriales y Castellanos, 1993; Castellanos *et al.*, 1996). En el caso de soya, la nodulación está regulada por factores internos y externos de los tejidos de la planta. Lee y col. (1991), demostraron a través del intercambio de injertos de mutantes hipernodulantes en cultivares comerciales normales, que la supernodulación es debida a la ausencia de un inhibidor de la nodulación mas que la presencia de un activador del desarrollo de nódulos. En el caso del frijol, se ha demostrado que la presencia de la bacteria dentro del nódulo es indispensable para que se dé la supresión de la nodulación (George y Robert, 1991).

Rendimiento de materia seca (paja y grano). El comportamiento de los diversos genotipos en la producción de paja y grano fue muy variable para los dos sitios de estudio, variabilidad que no fue estadísticamente significativa en el Estado de Durango pero sí en Guanajuato (Tablas 7 y 8). Estos resultados están de acuerdo con los reportados para el área de estudio por diversos investigadores (Quintero *et al.*, 1983; Acosta-Gallegos y Rosales. 1989; Arrieta-Montiel *et al.*, 1990; Castellanos-Ramos *et al.*, 1990; Ochoa-Marquez. 1990; Padilla-Ramirez *et al.*, 1990; Vega-Segovia. 1990; Castellanos-Ramos. 1992). Dada la variabilidad existente para la acumulación de materia seca y distribución de la misma en los diferentes órganos, se considera de gran utilidad determinar los factores que influyen sobre el rendimiento en grano en los diferentes genotipos. En el caso de soya y frijol, uno de los factores que influyen en la producción de materia seca estan

relacionadas con el metabolismo y la interacción cepa de *Rhizobium* versus cultivar son los responsables de los bajos índices de cosecha reportados (Hungria y Neves, 1987) y esto se podría atribuir al transporte de N. Por otra parte, Molina-García (1975), señala que es posible que el N del suelo afecte la producción de materia seca o el rendimiento en grano sin embargo, el aumento de materia seca es debido a la aplicación de N al suelo, la cual no se manifiesta en los rendimientos en grano, resultados que se han puesto de manifiesto en virtud de que la acumulación de N difiere significativamente entre las especies de leguminosas, en todas las etapas de crecimiento en el campo (George y Singleton, 1992). Esto explicaría, en parte, en virtud de que existen cultivares de frijol que no realizan una eficiente removilización del nitrógeno almacenado en las partes vegetativas hacia el grano y por otra parte, quizás de nueva cuenta, la limitante agua sea otro de los factores que limiten los rendimientos y que se explica por los resultados publicados por Castellanos-Ramos (1996) y por los bajos índices de cosecha reportados y encontrados en nuestro trabajo, donde el mejor cultivar lo fue "Pinto Villa" (0.33), mientras que FM-M-38 fue el más bajo (0.25).

Los promedios de rendimiento de los cultivares empleados en este trabajo, no sobrepasan los 600 kg ha⁻¹ y sin embargo, se han considerado como los más adecuados para la principal área productora de frijol en México (Norte-Centro) (Ochoa-Márquez, 1990), donde los materiales de hábitos precoces y de precocidad intermedia, han resultado ser los mejores productores, lo cual no es una característica que favorezca a la FBN. Esto debido a que, si bien es posible obtener genotipos precoces con buena fijación, los mejores fijadores, son de ciclos largos (Puebla-152 por ejemplo) y esto en general es la tendencia reportada por diversas investigaciones para el caso de frijol (Graham, 1981; Graham y Rosas, 1977; Paterson *et al.*, 1983; Phia y Munas, 1987b).

Porcentaje de N₂ derivado de la atmósfera. Los valores de fijación de nitrógeno encontrados constatan la variabilidad genética y bioquímica de los diversos genotipos, los promedios oscilaron entre 19-47 % N₂ fijo, estos valores son superiores a los reportados por Castellanos *et al.* (1996), para frijol sometido a estrés hídrico durante todo el ciclo o solamente en la etapa reproductora (11 y 9 % N₂ fijo respectivamente). Únicamente el genotipo "Rio Grande", superó al promedio reportado por los mismos autores para plantas con adecuada humedad (43 % N₂ fijo), sin embargo, al igual que para el caso de la nodulación los valores de fijación no se reflejaron en incremento en los rendimientos de grano, pero sí en la fijación de nitrógeno por cada genotipo (Tabla 7 y 11).

Para México, se ha demostrado que existe una amplia variabilidad para fijación de nitrógeno, los promedios oscilan de 4-59 %Ndda bajo condiciones de riego (Grageda-Cabrera, 1990, Castellanos, 1992; Peña-Cabriales y Castellanos, 1993; Peña-Cabriales *et al.* 1993; Hardarson *et al.* 1993) y en algunos casos simulando sequía en campo (Castellanos *et al.* 1996).

Las cantidades de N₂ fijado por una leguminosa, dependen de la eficiencia de la simbiosis, pero esta limitada genéticamente por el crecimiento de la planta y condiciones ambientales, principalmente por el estado de N en el suelo (Phia y Munns, 1987b).

Caracterización de los aislados de *Rhizobium* asociados a frijol. El empleo de técnicas moleculares en la sistemática microbiana, ha incrementado el soporte para una mejor comprensión de las relaciones entre los organismos y genera información relevante para la clasificación de microorganismos de acuerdo a su origen natural. Los análisis comparativos de secuencias de ácidos ribonucleicos ribosomales (RNAr) o los genes correspondientes, son protocolos comúnmente empleados para la filogenia microbiana. Por su contenido de información filogenética, las diferencias de las estructuras primarias de regiones conservadas de RNAr generan sitios blanco susceptibles a la hibridación con sondas específicas (Holbe *et al.*, 1988; Bascuña *et al.*, 1994; Fani *et al.*, 1994; Ludwig y Schleifer, 1994).

En nuestro estudio, los resultados de los PCR-RFLP's permitió confirmar que la especie que nodulan frijol es *Rhizobium etli*. Nuestros resultados son apoyados por Laguerre *et al.* (1993, 1994), mismos que están contribuyendo a la definición a nivel de especies de *Rhizobium* que nodulan leguminosas (Sessitch, *et al.* 1996). De igual forma, ésta metodología nos permitió discriminar a seis aislados que no presentaron las características de morfología colonial y nodulación de frijol separarlas y considerarlas como contaminantes (Tabla 13), demostrándose con esto que las herramientas moleculares en el análisis de regiones genéticas estables, son marcadores moleculares adecuados que se podrán emplear por un mayor número de laboratorios, con lo cual generará que se pueda comprender y entente mejor las relaciones filogenéticas con otros *Rhizobium* que nodulan frijol en otras áreas.

El panorama para una taxonomía comprensiva de *Rhizobium* es complicada, en virtud de la enorme diversidad genética, que se ha reportado para las especies de bacterias capaces de nodular frijol (*Phaseolus vulgaris*). Actualmente dos especies de *Rhizobium*: *R. tropici* (Martínez-Romero

et al., 1991) y *R. etli* (Segovia *et al.*, 1993) se han reconocido que nodulan frijol en América Latina. Por otra parte, se ha considerado que la especie de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* (Jordan, 1984), predomine para Europa y recientemente *Rhizobium* sp R602sp ha sido descrita como especie nueva (Laguerre *et al.*, 1993; 1994). Bajo condiciones de laboratorio, el cultivo de frijol es nodulado por una amplia gama de rizobios (Bromfiels y Barrau, 1990; Eardly *et al.*, 1985; Sadowsky *et al.*, 1988) los cuales en muchos casos inducen nódulos inefectivos.

Por otra parte, una vez que se ha definido la especie de estudio, dentro de la misma se encuentra una amplia gama de cepas. El poder distinguir una de otra, también es importante. A través de las técnicas tradicionales de resistencia a antibióticos, nuestros resultados indicaron la presencia de una amplia diversidad de patrones diferentes (Tabla 14) en los aislados de *Rhizobium* obtenidos de los tres cultivares de estudio, resultados que concuerdan con los reportados por diversos autores (Kremer y Peterson, 1982; Stein *et al.*, 1982; Chanway y Holl, 1986; Aguilar-Zacarias, 1990). Aguilar-Zacarias (1990) llevó a cabo estudios con poblaciones nativas de *Rhizobium* sp. en Zacatecas y encontró que un cultivar comercial puede ser nodulado hasta por doce diferentes cepas, resultado que también fue observado en el presente estudio para el caso del genotipo "Negro Querétaro", donde se observó una mayor diversidad de cepas, no solamente por la determinación de antibióticos, también lo fue por ERIC-PCR, MLEE y perfil de plásmidos. Es importante destacar que en la población analizada (59 aislados), tres patrones de resistencia, fueron comunes a los tres cultivares estudiados, lo que representó el 37% del total. Por el contrario, Aguilar-Zacarias (1990), encontró pocos patrones altamente representados que predominen en un área de determinada, esto atribuido posiblemente a una alta densidad de la rizosfera o en el suelo. Se ha señalado por Thurman y Bromfield (1988) que la leguminosa hospedera es un factor importante en la determinación de la población asociada. Nuestros resultados, indicaron que existe una gran cantidad de microorganismos (65,000 g de suelo) como se determinó por el método del Número Mas Probable NMP y se confirma por Aguilar-Zacarias (1990) para el caso de Zacatecas.

La técnica de PCR, está resultando de gran utilidad en la detección rápida y específica de bacterias del suelo (Picard *et al.* 1992;), caracterización de cepas de *Rhizobium* (Laguerre *et al.*, 1993; Lunge *et al.* 1994), identificación específica de cepas en los inoculantes (Tas *et al.*, 1995), ocurrencia de nódulos (Tas *et al.* 1996), relaciones filogenéticas (Ueda *et al.*, 1995; Young

et al. 1991). Para llevar a cabo una caracterización de cepas, mediante esta metodología, es conveniente, probar con un determinado número de iniciadores, los cuales pueden ser al azar denominado RAPD o bien ser más específicos para el género y/o especies de interés (Berg *et al.* 1994; Kay *et al.*, 1994) (Tabla 3).

De Bruijn (1992), consideró que dentro del grupo de bacterias Gram-negativas, se encuentra distribuido ADN consenso repetido, secuencias de Palíndromes Extragenicos Repetidos (REP) y Consensos Intergénicos Repetidos en Enterobacteriales(ERIC) y éstos, se emplearon con PCR para estudiar cepas de *Rhizobium meliloti*, encontrándose que resultaron ser altamente específicos para cada cepa. Ambos métodos REP y ERIC-PCR generaron grupos similares, considerándose que dichos métodos son útiles para la identificación y clasificación de cepas bacterianas. Resultados similares fueron encontrados por Sadowsky y Mowad (1995) y por Judd *et al.* (1993), quienes señalan que el procedimiento es adecuado para la diferenciación de serogrupos genéticamente relacionados, como en el caso de *Bradyrhizobium japonicum* y *B. elkanii*. Judd *et al.* (1993), encontraron que empleando REP+ERIC como iniciadores en la técnica de PCR, se lograron los resultados antes señalados en cepas de *Bradyrhizobium* spp. ampliamente diversas, sin embargo, esto no permite considerarlo como un medio apropiado para la clasificación de éstas, en virtud del número relativamente bajo de consensos encontrados en algunas de las cepas de bradyrhizobia. Sin embargo, es necesario que se considere que deberá de optimizarse las condiciones bajo las cuales se llevarán a cabo las amplificaciones de ADN (Versaloric *et al.* 1994), y considerar que el empleo de un par de iniciadores no podrá ser de amplio espectro para poder caracterizar una amplia gama de especies dentro del género *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* sin embargo, para el caso de la definición de especies, al menos a nivel de los diferentes rizobios, el empleo de un par de iniciadores (rDI y fDI) son suficientes para generar patrones de restricción definidos de acuerdo con la especie, empleándose como máximo siete enzimas diferentes de restricción (De Bruijn, 1992; Laguerre *et al.*, 1994)

Mediante esta metodología, nuestros resultados mostraron una amplia diversidad de patrones diferentes (Tabla 16) para los aislados obtenidos de los tres cultivares de estudio, destacándose que no se encontró en este caso, ningún patrón en común para los tres cultivares. Lo cual pone de manifiesto, la gran diversidad que en *Rhizobium* asociado a frijol pueden ser obtenidos dependiendo de las metodologías empleadas y que están de acuerdo con los resultados

publicados por diversos autores (Piñero *et al.*, 1988; Souza., 1990; Segovia *et al.*, 1991; Demezas *et al.*, 1991; Souza *et al.*, 1994; Early *et al.*, 1995). Resultados que son apoyados por la amplia diversidad de cepas nativas obtenidas de trébol, haba, chícharo y alfalfa determinados por Sessitch *et al.* (1996), cuando se empleó REP-PCR. Por otra parte, debe destacarse que de acuerdo a nuestros resultados no existe correlación entre los grupos obtenidos por RIA y ERIC-PCR, resultados que están de acuerdo con los publicados por Van Rossum *et al.* (1995), quienes trabajaron con un gran número de cepas y concentración de antibióticos, así como por Svenning *et al.* (1995), quienes caracterizaron las poblaciones rizobiales asociadas a trébol blanco tanto por REP como ERIC-PCR. Esto resultados pone de manifiesto que el análisis molecular (genotipo), no corresponde con el análisis fenotípico (RIA), dado que en general, la resistencia a los antibióticos se localizan en las entidades extracromosómicas denominadas plásmidos.

Si bien es cierto que las herramientas moleculares nos ayudan a definir problemas taxonómicos, y de caracterización de cepas, también es cierto que en ocasiones y de manera específica, en el caso de *Rhizobium* asociados a frijol no se ha encontrado o definido, iniciadores que sean de uso generalizado, para llevar a cabo una discriminación de cepas de manera apropiada, ya que si bien en nuestro caso se emplearon cuatro diferentes iniciadores, los mejores resultados fueron obtenidos con ERIC2, mientras que para el caso de *Rhizobium* asociados a frijol en Austria, lo fueron con RPO1 tanto por Sessitsch *et al.* (1996), de igual forma por Richardson *et al.* (1995) en *Rhizobium* sp.. Otra de las posibles causas de tal variabilidad, es la transferencia horizontal de genes (Flores *et al.*, 1988; García de Los Santos *et al.* 1996; Mercado Blanco y Toro, 1996). Además de que se ha argumentado que los elementos repetitivos, cambian más rápido, que el genoma como un todo (Martínez-Romero, 1994).

Para el caso de la Bradirhizobia, la situación es diferente, en virtud de que el proceso de fijación de nitrógeno se encuentra inserto en el cromosoma y no se tiene marcada interferencia por los plásmidos, con lo cual se han generado resultados de caracterización REP y ERIC-PCR que correlacionan entre sí, así como por otros procedimientos de caracterización (perfil de proteínas o análisis de ácidos grasos totales entre otros) (Zhan *et al.*., 1995; Nick *et al.*, 1995).

Como se indicó en otro apartado, la clasificación bacteriana se puede basar en características fenotípicas y/o genotípicas, sin embargo, recientemente el subcomite de la taxonomía de *Rhizobiaceae*, propuso recomendaciones taxonómicas en las que se incluyan los

estándares mínimos, involucrando para ello: tres características genotípicas (homología ADN:ADN, RNAr y RFLP's), tres características fenotípicas (propiedades simbióticas, características de cultivo y morfológicas) y una característica mixta (MLEE) (Graham *et al.*, 1991).

En nuestros resultados, a pesar de que solamente 45 aislados se emplearon para los análisis de MLEE, se determinaron (ocho ET'S) electroferotipos, lo cual demuestra una reducida diversidad, a pesar de que el tamaño de muestra es pequeño, pero significativa si consideramos los criterios señalados por Gordon *et al.*, (1995), dado que ésta es representativa de una región altamente productora de frijol y sobrepasa a los tamaños de muestra considerados por otros autores en el caso de México (Piñero *et al.*, 1988; Segovia *et al.*, 1991). De nuestros resultados es de destacar, la presencia de un electroferotipo dominante (ET-1), ello no necesariamente indica que las cepas que pertenecen a éste grupo cromosómico dominante, sea altamente efectivo, resultados similares se han reportado para el caso de *R. leguminosarum* biovar *trifolii* (Leung *et al.*, 1994a,b,c).

En diversas localidades de México (Puebla, Hidalgo y Morelos principalmente) se han realizado estudios de movilidad electroforética para determinar la estructura y diversidad genética de las poblaciones de *Rhizobium* que nodulan frijol común (Piñero *et al.*, 1988; Souza, 1992; Segovia *et al.*, 1993; Souza *et al.*, 1994) y poblaciones no nodulantes (Segovia *et al.*, 1991). En esta enorme riqueza genética, se podrán encontrar cepas capaces de fijar N₂ y nodular leguminosas en diferentes hábitats y con alta eficiencia (Souza *et al.*, 1994). Asimismo, se ha encontrado una amplia diversidad genética y diferencias entre poblaciones sobre una pequeña escala espacial y temporal al igual que la presencia de recombinantes, lo que indica que en estas bacterias los nuevos genes podrían fácilmente escaparse de la población, lo que sugiere que la recuperación y éxito de una cepa particular modificada e introducida de *Rhizobium etli* puede ser muy baja (Souza *et al.*, 1994). Si consideramos éstas regiones, con nuestra área de estudio, contrastan con respecto a los estudios previos en las condiciones climatológicas, siendo aquellas más benévolas para el cultivo, que la semiárida, región a la cual pertenece Fco. I. Dgo.

Por otra parte, esta metodología mostró una buena correlación con los análisis de la subunidad 16S del rRNA, resultados que concuerdan con los publicados por Sessitsch *et al.*, (1996) para el caso de frijol, sin embargo, se ha reportado que en el caso de Bradyrhizobia,

también se ha reportado resultados similares (Bottomley *et al.*, 1994), confirmando con esto la utilidad futura de la técnica.

Empleando los parámetros de distancia genética, los resultados mostraron que la estructura cromosómica de la población rizobial que nodula frijol es clonal y están de acuerdo con diversos estudios (Piñero *et al.*, 1988; Demezas *et al.*, 1991; Martínez-Romero *et al.*, 1991; Segovia *et al.*, 1993; Souza *et al.*, 1994; Gordon *et al.*, 1995). Así mismo, se determinó una reducida variación polimorfa para las diferentes enzimas evaluadas como consecuencia, se encontró la diversidad más baja reportada para esta especie ($H=0.105$). Una distancia genética de 0.23, establecen que una sustitución en uno o más codones se ha llevado a cabo en un 23% de el loci genético, lo cual indica que esto es una impresionante divergencia genética (Dobzhansky, 1978), esto es lo que se ha indicado para el género de *Drosophila*.

Por otra parte, las electroformas pueden estar provistas de una clase especial de variantes. Si la carga electrostática es un carácter adaptativo importante de las proteínas, las electroformas pueden ser raras, comparadas con variantes que no afectan la carga de polipéptidos (Ayala, 1978).

Aun y cuando la diversidad genética reportada en la literatura para *R. etli* es de las más altas ($H=0.691$), que la previamente reportada para alguna simple especie de bacteria bien estudiada, incluyendo *Escherichia coli* (Piñero *et al.*, 1988), hasta ahora no se ha considerado la influencia de las condiciones ambientales sobre dicha diversidad. En este estudio podrían ser la sequía y el uso de monocultivo como los posibles responsables de reducir dicha diversidad genética y que los resultados encontrados por Aguilar-Zacaria (1990), indicaron que en aquel suelo en el cual se utilizó una alta dosis de fertilización (120 kg N ha^{-1}) como sulfato de amonio, se registró el menor número de patrones de RIA. estos son algunos elementos que nos hacen pensar en lo planteado por Sombroek (1994) quien señala “el monocultivo, con altas tasas de entrada de fertilizantes minerales y control químico de enfermedades y plagas, disminuirán la diversidad de especies, tanto en la superficie como bajo del suelo, o en el último de los casos las inactivan (*Rhizobium* y micorrizas)”.

Por otra parte, Flores *et al.* (1988), señalan que bajo condiciones de estrés en nuestro caso sequía) o manipulación genética, las células rizobiales presentan rearrreglos genéticos y además reducen el intercambio genético, lo cual podría ser una explicación para la obtención de una diversidad baja (solamente dos ET's), de igual forma, otro factor como los señalados por Young

(1985), es quizá la estrecha base geográfica de sus muestras y la ausencia de manera natural del frijol en Inglaterra, los responsables de una baja diversidad.

Las predicciones de que las adaptaciones a diferentes hábitats pueden alterar significativamente las secuencias de aminoácidos, particularmente en el caso de enzimas reguladoras moduladas alostéricamente, surge el hecho de si ésta variabilidad, detectada por ensayos electroforéticos, refleja la adaptación diferencial que sobre las consideraciones fisiológicas se han llegado a suponer (Johnson, 1978). Si en realidad, las variantes en movilidad electroforéticas reflejan adaptaciones diferenciales, entonces, se podrá predecir que dicha variabilidad correlacionará con diversidad ambiental, esto es, que el número de nichos disponibles de alguna manera señalan la variabilidad. Un gran número de estudios reportan correlación entre niveles de variabilidad entre proteínas y latitud, diversidad de especies entre otras. No es claro, si la variabilidad en los trópicos se podría ver como reflejo de estabilidad de algún factor ambiental tal como temperatura, o variación de algún factor, tal como diversidad de alimento disponible (Johnson, 1978). El punto de vista más aceptado es que, el polimorfismo se mantiene en una población natural por alguna forma de selección balanceada. Se propone que la selección no actúa sobre loci polimórficos individuales, por el contrario lo hace sobre fenotipos metabólicos integrados, ya que el polimorfismo se selecciona específicamente porque este amortigua la integración funcional de perturbaciones ambientales (Johnsossn, 1978), y con ello posiblemente sea la base para una posible explicación de la existencia de micronichos que sean llenados por un grupo cromosómico el ET1 definido de *Rhizobium* que nodula frijol en Durango, dadas las condiciones agroecológicas que prevalecen para dicha área.

Por otra parte, el hospedero, parece jugar un papel importante en la diversidad genética encontrada. Así, en el caso de *R. meliloti*, se han determinado dos grupos diferentes (A y B) y en el grupo B, parece estar restringido a las especies de *Medicago* anuales cultivadas, mientras que las cepas de la subdivisión A1 se aislaron de una serie de *Medicago* anuales y perenes y son aparentemente cosmopolitas (Gordon *et al.*, 1995). Sin embargo, en nuestro estudio, tal situación no parece operar, al contrario tal parece que el uso del monocultivo tiende a reducir la diversidad genética.

Los análisis con cepas desprovistas (curadas) de plásmidos de *R. leguminosarum* biovar *viciae* (Hynes, 1990), *R. etli* (Brom *et al.*, 1992) y *R. fredii* (Barbour y Elkan, 1990), han

demostrado que las secuencias requeridas para alcanzar los niveles de competencia de las cepas están distribuidos entre diversos plásmidos no simbióticos (nopSym). La capacidad simbiótica de las cepas rizobiales, depende de la interacción de un gran número de factores, algunos de los cuales están directamente involucrados en el proceso, mientras que otros lo hacen indirectamente. Las secuencias genéticas relacionadas con esta serie de factores están distribuidas entre los diferentes plásmidos (García de los Santos *et al.*, 1996). Asimismo, Mercado-Blanco y Toro (1996), señalan que grandes nopsym autotrasmisibles están ligados con la síntesis de bacteriocininas y que lo más probable es que afecten la competencia. En el caso de *R. etli*, Brom *et al.*, (1992), señalan que el plásmido e se requiere para mostrar la competencia de la cepa tipo silvestre CFN-42. Mientras que en *R. leguminosarum* biovar *trifolii*, los plásmidos cripticos (nopSym), afectan las características simbióticas. Por ejemplo el pRtrW14-2a, parece incrementar la nodulación y el curado del plásmidos pRtrW8-7b resulta en un retardo en la formación de nódulos. En *R. meliloti*, se ha demostrado que los genes de origen de nopSym están directamente involucrados en la eficiencia nodular (Toro y Olivares, 1986)

Tal y como se ha señalado por otros trabajos, *Rhizobium* presenta una diversidad en cuanto al número y tamaño de plásmidos (Aguilar-Zacarias, 1990; Martínez-Romero *et al.*, 1991; Segovia *et al.*, 1993), lo cual se constata por los resultados obtenidos en el presente estudio (Figura 5) y los cuales probablemente son el resultado de los constantes rearrreglos que en estas población se esten llevando a cabo año con año, donde el estres (escasez de agua) es una de las razones que lo explicase. Por el contrario Scwandt (1989), estudiando la estabilidad de plásmidos de *R. phaseoli* encontró que de 752 aislado, solamente uno presentó un perfil diferente, indicando que los perfiles permanecen sin al pasar por la planta. En nuestro estudio, la diversidad de patrones encontrados posiblemente son los responsables de la alta diversidad de resistencia a los antibióticos, en virtud de la correlación observada entre los perfiles de plásmidos y patrones diferentes de resistencia a antibióticos con las cepas evaluadas, donde solamente los aislados Q4 y Q22 que pertenecen a un mismo grupo de RIA, no presentaron el mismo perfil de plásmidos. Sin embargo, tal y como se señala por Van Rossum *et al.* (1995), en el sentido de que las características fenotípicas y genéticas pueden estar o no correlacionadas, ya que si bien una alta relación en el rADN es un pre-requisito, esto no necesariamente nos llevará a altos valores de similitud entre perfiles de RAPD, de proteínas y utilización de substratos.

La variabilidad de plásmidos nos indica que estos podrían jugar un papel importante en la caracterización y definición de una determinada cepa, en virtud de que una de las características sobresalientes de esta bacteria es su capacidad simbiótica y que no se ha consignado para las poblaciones nativas en conjunto con los hospederos y que debería de reconsiderar la posible validez para definir una cepa.

Los modelos de perfiles de proteínas son útiles en la subdivisión de grupos serológicos de diferentes especies de rizobia, resulta ser una poderosa herramienta, para identificar cepas, sin embargo el procedimiento es laborioso (Jackman, 1987; Pastorini, 1992). Así mismo se ha propuesto que el método se base en el procedimiento de Lammi para una apropiada estandarización de la técnica. Se ha considerado también que la electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones ofrece una mejor resolución, ésta es considerablemente poco práctica para manejar un gran número de cepas y se dificulta su estandarización (Jackman, 1987). Resultados obtenidos por Roberts *et al.*, (1980), lograron diferenciar grupos rizobiales de crecimiento rápido (grupo II), los cuales se encontraban completamente relacionados y fueron muy diferentes a los de crecimiento rápido (grupo I), éstos fueron difícil de distinguir con claridad en virtud de la amplia diversidad mostrada, especialmente entre el grupo de los rizobios que nodulan frijol. Esta metodología a resultado ser satisfactoria para la definición de especies de *Rhizobium*, cuando se emplea como marcador a una proteína específica como lo es la enzima glutamato sintetasa II (Taboada *et al.*, 1996).

Resultados en los cuales se ha utilizado PAGE-SDS de una dimensión, lograron establecer una mejor diferenciación a nivel de cepas dentro de un mismo serogrupo para *Bradyrhizobium japonicum* (Kamicker y Brill, 1986; Brosckman y Bezdicek, 1989).

Los resultados indican, al igual que en el caso de MLEE, que cuando se analiza las características genéticas como un todo, es un indicativo del comportamiento como tal del organismo, ello lo demuestra resultados encontrados para las diferentes cepas analizadas, indicando que el genotipo correspondió con el perfil de proteínas encontradas para el procedimiento establecido. Sin embargo, la metodología es complicada en función de la estandarización y procesamiento de muestra. Los rangos de peso molecular fueron de 135 hasta 15 Kilodaltones, los cuales concuerdan con los publicados por Espinosa-Victoria *et al.* (1989) para rizobios que nodulan frijol y por Arredondo-Peter y Escamilla (1993), donde en este último

caso, empleando cepas diferentes de otras localidades obtenidas por el Centro de Investigación Sobre Fijación de Nitrógeno en Cuernavaca, Mor. los patrones de bandedo fueron muy diferentes entre cada una de las localidades.

Finalmente, cabe señalar que por los diferentes métodos de caracterización de cepas utilizados, se pone de manifiesto que el análisis de microorganismos simbióticos, en el caso de *Rhizobium* o *Bradyrhizobium*, la caracterización cromosómica (MLEE), en apariencia, relativamente simple, pone de manifiesto las dificultades existentes para una clara definición a nivel de cepa, en virtud de no correlacionar con los diferentes métodos empleados, esto probablemente se deba a la presencia de plásmidos, como un factor principal que interfiere, así como a la dificultad de encontrar un sistema de estandarización universal para el procesamiento de las muestras, al someterse a la diversidad de métodos disponibles, para definir una cepa o especie en particular.

Actividad Reductora de Acetileno (ARA). Los ensayos de reducción de acetileno con cepas seleccionadas de los grupos representativos de ERIC-PCR, demostraron que pocos de los aislados presentaron altos valores de actividad reductora de acetileno, así mismo, que los aislados obtenidos de un mismo genotipo, no necesariamente se comportaron mejor con su correspondiente cultivar bajo condiciones de invernadero, estos resultados están de acuerdo con los reportados por Leung *et al.*, (1994 a,b) para *R. leguminosarum* biovar *trifolii*. Únicamente un aislado en el cultivar "Negro Querétaro" (Q17) presentó el valor más alto de ARA, mientras que los otros dos Q14 y Q21 presentaron valores bajos (Figura 6). Así mismo, los resultados de caracterización con ERIC-PCR mostraron que Q14 y Q21, tienen un patrón en común y están compuestos cada uno de varios aislados, indicándose con ello que la ocurrencia de una cepa ineficiente es frecuente de acuerdo a las condiciones de estudio.

Por otra parte, Nutman (1984), señala que para el caso de la simbiosis en trébol, la efectividad está influida por múltiples genes, dicha característica es heredada de manera compleja, asociada con nodulación temprana y la formación de gran cantidad de tejido persistente conteniendo bacteroides. Mientras que Soberon-Chávez y col. (1988), encontraron más cambios estructurales del plásmido *sym*, generando nuevos arreglos que afectan tanto a genes *nif* y modificación de la expresión de la capacidad de nodulación, mientras que Brom y col. (1988)

señalan que diferentes tipos de plásmidos *sym*, pueden conferir una determinada capacidad para establecer simbiosis eficiente. Estas consideraciones se pueden constatar por el hecho de que patrones diferentes de perfiles de plásmidos fueron obtenidos en nuestros resultados, mientras que Wheatcroft *et al.* (1990), señalan que las modificaciones de las estructuras superenrolladas del ADN pueden ser responsables del desarrollo del nódulo y para la expresión de genes simbióticos en el caso de *R. meliloti*.

Los resultados obtenidos de la diversidad genética, nos indican que en el área de estudio, existe un electrotipo que predomina (ET-1) desde el punto de vista genético, pero desde el punto de vista simbiótico, existe una amplia diversidad, la cual se demuestra en virtud de que las cepas seleccionadas por ERIC-PCR, pertenecen a dicho electrotipo y presentaron diferentes perfiles de plásmidos al igual que cuando se emplean métodos tradicionales o moleculares, con éstos y los resultados obtenidos del invernadero, nos hace suponer que el comportamiento simbiótico dependerá de las condiciones experimentales a que sea sometido el microorganismo.

Competencia entre Cepas Nativas de *Rhizobium* y cepa transconjugante CIAT-899::*gusA*₁-B. Se conoce que las leguminosas permiten a las cepas rizobiales homólogas penetrar y subsecuentemente desarrollar nódulos, mientras que cepas heterólogas y otras bacterias del suelo no se les permite la entrada. La penetración de los pelos radicales se encuentra bajo el control de la planta y la bacteria. Se considera que las infecciones son transitorias y ocurren más rápidamente en la zona de alargamiento de la raíz y la zona de pelos radicales emergentes más pequeños (Vance, 1983). Sin embargo, George y Robert (1992), señalaron que la competencia parece ser un carácter flexible, pero únicamente entre aquellas cepas que poseen una capacidad básica para competir, podrán alcanzar una significativa ocupación de nódulos en planta. La plasticidad de la competencia puede ser únicamente observada bajo condiciones controladas. No se tiene evidencia de que la competencia de las cepas en el campo este en función del número de células en la rizosfera (Abaido *et al.*, 18990; Moawad *et al.*, 1984; Robert y Schmidt, 1983), además de que muchas variables ambientales, características intrínsecas de la rhizobia y determinantes genéticos del hospedero contribuyen a una satisfactoria o falla de la cepas rizobiales para ocupar una significativa proporción de nódulos, bajo una serie de condiciones dadas (Thies *et al.*, 1992). Nuestros resultados de competencia mostraron que dos de las tres cepas evaluadas

fueron más competitivas que la CIAT-899::gusA₁₀-B (Tabla 18). La cepa Q21 (*R. etli*), resultó ser pobre competidora, dado que por cada nódulo formado por ésta, se formaron dos por CIAT-899::gusA₁₀-B, resultados similares se encontraron en estudios de competencia entre otras cepas donde las pertenecientes a la especie *R. etli* resultaron ser menos competidoras (Martínez-Romero y Rosenblueth, 1990).

Se ha demostrado que en el caso de chícharo, del cv Afganistán la nodulación por una cepa nodulante de *Rhizobium* puede ser suprimida por la presencia de una cepa no nodulante. Así mismo, se ha encontrado en el caso de *R. meliloti*, que la formación de nódulos por un determinado número de cepas, se define por su capacidad para competir por los sitios de nodulación de otra (Lie *et al.*, 1982). Streeter (1994), señaló que, aunque las estimaciones de respuesta a la inoculación varían año con año, la mayoría de sus resultados indican que entre 5-10% de los nódulos serán formados por la cepa inoculada el primer año. La aparente competencia de las cepas puede variar dependiendo de el genotipo hospedero.

El empleo de marcadores moleculares, tal como el gen gusA₁₀, se considera de particular importancia para estudios de ecología de *Rhizobium* (Wilson *et al.*, 1994; Akkermans *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1995; Sessitsch *et al.*, 1996). Esta metodología tiene una serie de ventajas en estudios de competencia en comparación con otras como lo son: resistencia a antibióticos inducida (Bushby, 1981; Turco *et al.*, 1986), anticuerpos fluorescentes, etc. (Schmidt, *et al.*, 1976). Los resultados indicaron que existe variabilidad de competencia entre cepas nativas y las inoculadas, cuando se inoculan en pareja. El aislado Q21 fue significativamente menos competitivo que Q16 y Q19, así mismo se observa que existe una tendencia en cuanto al mismo número de nódulos formados, tanto en la inoculación simple, como en inoculación en mezcla, empleando el mismo número de células, lo cual al parecer indica que el hospedero deja un número definido de sitios disponibles para que sean ocupados por las células rizobiales al parecer, cuando la cepa es menos competitiva, se reduce el número de nódulos o bien la planta induce una respuesta de restricción de la nodulación. Resultados de este tipo se han observado para el caso de soya (Cregan y Keyser, 1986; Keyser y Cregan, 1987; Cregan y Sadowsky, 1989; Cregan *et al.*, 1989; Sadowsky *et al.*, 1991; Sadowsky y Cregan, 1992; Ferrey *et al.*, 1994; Lohrke *et al.*, 1995; Sadowsky *et al.*, 1995). Sin embargo, en el caso de frijol se ha considerado como una especie muy promiscua, la cual puede ser nodulada por un número alto de cepas diferentes de

rizobia y por tanto se cree que no presente una especificidad por un determinado tipo de cepa (Martínez-Romero *et al.*, 1991; Hernández-Lucas *et al.*, 1995).

Es claro que la relación *Rhizobium*-leguminosa juega un papel preponderante en el ciclo del N, donde el proceso de nodulación y FBN dependerán del tipo de planta y flora nativa. Así mismo, una mayor nodulación no es una garantía de un incremento en biomasa ni semilla aún y cuando se incremente la FBN.

De manera global, el trabajo aporta elementos importantes que permiten reconsiderar a las cepas nativas de *Rhizobium* asociadas a frijol, como una alternativa que permitirá mejorar los rendimientos del cultivo en México. Es indudable que los estudios de las relaciones genéticas entre los *Rhizobium* sp. y de éstos con los genotipos comerciales de frijol, resultará una valiosa alternativa para utilizar, de una manera mas razonada y segura, los inoculantes en frijol, empleando algunas cepas nativas de las zonas productoras del grano.

CONCLUSIONES.

- 1.- La fijación de nitrógeno en frijol bajo condiciones de temporal, expresado como %N_{dda} fue de 19-46 %, lo cual representan de 8 a 25 kg de N fijado ha⁻¹
- 2.- *Rhizobium etli* es la especie dominante.
- 3.- No se observó correlación entre los diferentes métodos empleados para caracterizar los aislados de *Rhizobium* sp. excepto para PCR-RFLP y MLEE.
- 4.- Se observó una baja diversidad genética para *Rhizobium* (H=0.105). Esto podría estar relacionado con las condiciones adversas de la región de estudio.
- 5.- Las cepas nativas de *Rhizobium* Q16 y Q19, fueron competitivas, mientras que Q21, resultó pobre competidora y formó un menor número de nódulos en el genotipo "Negro Querétaro" con respecto a la cepa CIAT-899 : :*gus* A₁₀-B

PERSPECTIVAS

Ante la necesidad alimentaria mundial y el crecimiento de la población, resulta imperativo incrementar los rendimientos de los cultivos básicos. Dentro de las alternativas para lograrlo se encuentra el uso de los fertilizantes nitrogenados, como alternativa inmediata, sin embargo, el proceso biológico de suministro "económico"/ecológico de N a través de una interacción simbiótica, jugará un papel determinante, no solamente para incrementar los rendimientos de los cultivos, sino para aminorar el deterioro del suelo, la contaminación por nitratos y el consumo de energéticos, mediante la producción de fertilizantes nitrogenados.

En México se cuenta con una enorme riqueza de flora, dentro de las cuales se encuentran las leguminosas, las cuales deberán ser consideradas ampliamente como alternativas de solución futura para mejorar e incrementar los rendimientos de cultivos y tener suelos más fértiles.

Para el caso específico de frijol, se deberá contemplar un programa de mejoramiento genético, en el cual se considere los potenciales de rendimiento así como fijación biológica de nitrógeno, que conlleven a incrementar al menos en un 30% los rendimientos y tasas de fijación, con respecto a los promedios reportados para las diferentes zonas agroecológicas del país.

Los problemas específicos que pueden ser resueltos son: potencial de fijación biológica de nitrógeno y uso eficiente de fertilizantes de los principales genotipos de frijol actualmente utilizados, de igual forma, el uso potencial de las poblaciones nativa como potenciales inoculantes así como evaluar el efecto de la incorporación de los residuos de frijol en rotación con gramíneas.

LITERATURA CITADA

- Abaidoo, R.C., T. George, B.B. Bohlool y P.W. Singleton. 1990. Influence of elevation and applied nitrogen on rhizosphere colonization and competition for nodule occupancy by different rhizobial strains on field-grown soybean and common bean. *Can. J. Microbiol.* 36:92-96.
- Acosta-Gallegos J.A., J.Z. Castellanos, S., Nuñez-González, R., Ochoa-Márquez, R. Rosales Serna y S.P. Singh. 1995. Registration of "Flor de Mayo M38" common bean. *Crop Sci.* 35 :941-942.
- Acosta-Gallegos J.A. y R. Rosales-Serna. 1989. Biomasa y sus componentes en variedades indeterminadas de frijol. En : Informe sobre investigación de frijol 1988. SARH. INIFAP. Durango, Dgo. pp. 97-106.
- Aguilar-Zacarias, M.C. 1990. Caracterización de cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* del estado de Zacatecas. Tesis Maestría. CINVESTAV-Unidad Irapuato, Irapuato, Gto.
- Akkermans, A.D.L., M.S. Mirza, H.J.M. Harmsen, H.J. Blok, P.R. Herron, A. Sessitsch y W.M. Akkermans. 1994. Molecular ecology of microbes : A review of promises pitfalls and true progress. *FEMS Microbial Rev.* 15 :185-194.
- Akoa, S., Y. Nakayama, S.H. Kim, P.B. Francisco Jr. y S. Higashi. 1994. *Rhizobium* host-range extension by introduction of *Rhizobium trifolii* nod genes. *Soil Sci. Plant Nutr.* 40:703-708.
- Alexander, M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. AGT edit. México.
- Alexander, M. 1985. Ecological constraints on nitrogen fixation in agricultural ecosystems. *Advances in Microbial Ecology.* 8 :163-183.
- Aniabile, C. 1988. La resistencia bacteriana a los antibióticos. *Ciencia y Desarrollo.* 80:57-68.
- Amarger, N. 1981a. Competition for nodule formation between effective and ineffective strains of *Rhizobium meliloti*. *Soil Biol. Biochem.* 13:475-480.
- Amarger, N. 1981b. Selection of *Rhizobium* strains on their competitive ability for nodulation. *Soil Biol. Biochem.* 13:481-486.
- Araujo, R.S., Maya-Flores, J., Barnes-McConrell, D, Yokoyama C, Dazzo F.B. y Bliss F.A. 1986. Semiclosed tube cultures of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) for enumeration of *Rhizobium phaseoli* by the most-probable-number technique. *Appl. Environ. Microbiol.* 52 :71-79.

- Archer, G.L. y D.M. Niemeyer. 1994. Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. *trends in Microbiology*. 2 : 343-347.
- Arredondo-Peter, R. y E. Escamilla. 1993. Sodium duodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis protein banding among *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains isolates from the Mexican bean *Phaseolus coccineus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3960-3963.
- Arieta-Montiel, MP.; J.A. Acosta-Gallegos y R. Rosales-Serna. 1990. Biomasa y sus componenetes en variedades indeterminadas de frijol bajo temporal. En : Informe sobre investigación de frijol 1989. SARH. INIFAP. Durango, Dgo. pp. 49-58.
- Atkins, C.A. 1986. The legume *Rhizobium* symbiosis : limitations to maximizing nitrogen fixation. *Out Look on Agriculture*. 15 :129-134.
- Bascuña, C.R., J.G. Mattson, G. Bolske y K.E. Johansson. 1994. Characterization of the 16S rRNA genes from mycoplasma sp strain F38 and development of an identification system based an PCR. *J. Bacteriol.* 176:2577-2586.
- Barbour, W.M. y G.H. Elkan. 1990. Physiological Characteristics and competitive ability of plasmid cured derivates of *Rhizobium fredii* USDA 206. *Arc. Microbiol.* 154 :1-4
- Berg, D.E., N.S. A. Kaopyants y D. Kersulyte. 1994. Finger print microbial genomes using RAPD or AP-PCR method. *Meth. Mol. Cellular Biology*. 5:13-24.
- Bjourson, A.J., C.E. Stone y J.E. Cooper. 1992. Combined subtraction hybridization and polymerase chain reaction amplification procedure for isolation of strain-specific *Rhizobium* DNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2296-2301.
- Black, C.A. 1975. Relación suelo-planta. Hemisferio Sur. Argentina. p75.
- Bliss, F.A., P.A.A. Pereira, R.S. Araujo, R.A. Henson, K.A. Kmiecik, J.R. McFerson, M.G. Teixeira y C.C. Da Silva. 1991. Registration of the five high nitrogen fixing common bean germoplasm lines. *Crop Sci.* 29:240-241.
- Bliss, F.A. 1993a. Breeding common bean for improved biological nitrogen fixation. *Plant Soil.* 152 :71-79.
- Bliss, F.A. 1993b. Utilizing the potential for increased nitrogen fixation in common bean. *Plant soil.* 152 :157-160.
- Bahloul, B.B. y E.L. Schmidt, 1973. Persistence and competition aspect of *Rhizobium japonicum* observed in soil by immunofluorescence microscopy. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 37:561-564.

- Boonkerd, N., D.F. Weber y D.F. Bezdicek. 1978. Influence of *Rhizobium japonicum* strain and inoculation method on soybean grown in rhizobial populated soil. *Agron J.* 70:547-549.
- Boonkerd, N. y R.W. Weaver. 1982. Survival of cowpea rhizobia in soil as affected by soil temperature and moisture. *Appl Environ. Microbiol.* 43:585-589.
- Bottomley P.J., H.H. Cheng y S.R. Strain. 1994. Genetic structure and symbiotic characteristic of a *Bradyrhizobium* population recovered from a pasture soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1754-1761.
- Brill W.J. 1980. Biochemical aspect of nitrogen fixation. *Microbil. Rev.* 44 :449-467.
- Brockwell J., E.A. Schwinghamer y R.R. Gault. 1977. Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environmental. V. A critical examination of the stability of antigenic and streptomycin-resistance markers for the identification of strains of *Rhizobium trifolii*. *Soil Biol. Biochem.* 9:19-24.
- Brockman, F.I. y D.F. Bezdick, 1989. Diversity within serogroups of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae in the Palouse region of eastern Washington as indicated by plasmid profiles, intrinsic antibiotic resistance and topography. *Appl Environ. Microbiol.* 55 :109-115.
- Brom, S., E. Martínez, G. Dávila y R. Palacios. 1988. Narrow and broad host-range symbiotic plasmids of *Rhizobium spp* strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1280-1283.
- Brom, S. García de los Santos A., Girard M.L., Dávila G., Palacios R. y Romero D. 1991. High-frequency rearrangements in *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli plasmids. *J. Bacteriol.* 173 :1344-1346.
- Brom, S. García de los Santos A., Girard M.L., Stepkowsky T., Flores M, Dávila G., Romero D. y Palacios R. 1992. Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli are required for optimal symbiotic performance. *J. Bacteriol.* 174 :5183-5189.
- Bromfield, E.S.P., M. Stein y R.P. White. 1982. Identification of *Rhizobium* strain on antibiotic concentration gradient. *Ann. Appl. Biol.* 101:269-277.
- Bromfield, E.S.P. 1984. Variation in preference for *Rhizobium meliloti* within and between *Medicago sativa* cultivars grown in soil. *Appl. environ. Microbiol.* 48:1231-1236.
- Bromfield, E.S.P. y L.R. Barran. 1990. Promiscuous nodulation of *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium atropurpureum* and *Leucaena leucocephala* by indigenous *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Microbiol.* 36:369-372.
- Bushby, H.V.A, 1982. Ecology. En: Nitrogen fixation. W.J. Broughton edit. Clarendon Press. 2:35-75.

- Castellanos-Ramos J.Z. 1990a. Fijación biológica de N₂ en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) bajo condiciones de sequía. Tesis Doctoral. CINVESTAV Unidad Irapuato. Irapuato, Gto.
- Castellanos J.Z., J.A. Acosta-Gallegos, J.C. Gómez-Lugo y J.J. Peña-cabriales. 1990. Capacidad de Fijación de nitrógeno de 12 variedades de frijol. En. resúmenes de investigación en frijol 1989. SARH. INIFAP. Durango, Dgo. pp.122-126.
- Castellanos J., Peña-Cabriales J.J. y Rojas Martínez I. 1993. Análisis retrospectivo del uso de inoculantes con cepas élite en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Turrialba. 43 :89-99.
- Castellanos J.Z., J.A. Acosta-Gallegos, y J.J. Peña-cabriales. 1996. ¹⁵N determined dinitrogen fixation capacity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars under water stress. J. Agric. Sci. Cambridge. in press.
- Chaverra, M.H. y P.H. Graham. 1992. Cultivar variation in traits affecting early nodulation of common bean. Crop Sci. 32 :1432-1436.
- Chonway, C.P. y F.B. Holl. 1986. Suitability of intrinsic antibiotic resistance as a method of strain identification in *Rhizobium trifolii*. Plant Soil. 93 :287-291.
- Cooper, J.E. 1979. Rapid method for counting antibiotic-resistant rhizobia in soil. Soil Biol. Biochem. 11:433-435.
- Cregan P.B. y Keyser H.H. 1986. Host restriction of nodulation by *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA 123 in soybean. Crop Sci. 26 :911-916.
- Cregan P.B., H.H. Keyser y M.J. Sadowsky. 1989a. Soybean genotype restricting nodulation of previously unrestricted serocluster 123 bradyrhizobia. Crop Sci. 29 :307-312.
- Cregan P.B., H.H. Keyser y M.J. Sadowsky. 1989b. Host plant effects of nodulation and competitiveness of the *Bradyrhizobium japonicum* serotypes strains constituting serocluster 123. Appl. Environ. Microbiol. 55 :2532-2536.
- Cubo, M.T., A.M. Buendia-Clavera, J.E. Beringer y E. Ruiz-Sainz. 1988. Melanin production for *Rhizobium* strains. Appl. Environ. Microbiol. 54 :1812-1817.
- Dámaso- López. D. 1990. Antibacterianos. Marketing Pharm. Madrid, España. pp21-36.
- Danso, S.K.A. 1995. Sustainable agriculture. the role of biological nitrogen fixing plants. En : Nuclear technique in soil plant studies for sustainable agriculture and environmental preservation. FAO/IAEA. Vienna Austria. pp 205-224.
- Danso, S.K.A., G. Hardarson y F. Zapata. 1993. Misconception and practical problems in the use of ¹⁵N soil enrichment technique for estimating N₂ fixation. Plant soil. 152:25-52.

- Darrasse, A., S. Priou, A. Kotoujansky y Y. Bertheau. 1994. PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia caratovora* in relation to potato disease. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1437-1443.
- Dart, P. 1977. Infection and development of legumes nodules. In: a treatise on dinitrogen fixation. Section III. Biology. edited by R.W.F. Hardy and W.S. Silver. Wiley, New York. pp367-472.
- Davis, J.H.C., K.E. Guiller, J. Kipe-Nolt y M. Awah. 1988. Nonnodulating mutants in common bean. *Crop Sci.* **28**:859-860.
- Dazzo, F.B. y D.H. Hubbell. 1975. Antigenic differences between infective and noninfective strains of *Rhizobium trifolii*. *Appl. Microbiol. Aus.* **30**:172-177.
- Debelle, F. y S.B. Sharma. 1986. Nucleotic sequence of *Rhizobium meliloti* RCR2011 genes involved in host specificity of nodulation. *Nucl. Acid Res.* **14**:7453-7472.
- De Bruijn, F. J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolate and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2180-2187.
- DeJonj, T.M., N.J. Brewing, A.W.B. Johnston y D.A. Phillips. 1982. Improvement of symbiotic properties of *Rhizobium leguminosarum* by plasmid transfer. *J. Gen. Microbiol.* **128**:1829-1838.
- Delves, A.C., A. Matthews, A. Day, A.S. Carter, B.J. Carroll y P.M. Greshoff. 1986. Regulation of the soybean-*Rhizobium* nodule symbiosis by shoot and root factors. *Plant Physiol.* **82**:558-590.
- Demezas, D.H., T.B. reardon, J.M. Watson y A.H. Gibson. 1991. Genetic diversity among *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strains by alloenzyme and restriction fragment length polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** :3489-3495.
- Díaz, C.L., L.S. Melchor, P.J.J. Hooykas, B.J.J. Lugtenberg y J.W. Kijne. 1989. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature.* **338**:579-581.
- Djordjevic M.A., P.R. Schofield y B.G. Rolfe. 1985. Tn5 mutagenesis of *Rhizobium trifoli* host-specific nodulation genes result in mutants with altered host-range ability. *Mol. Gen. Genet.* **200**:463-471.

- Djordjevic M.A., R.W. Innes, C.A. Wijffelman, P.R. Schofield y B.G. Rolfe. 1986. Nodulation of specific legumes is controlled by several distinct loci in *Rhizobium trifolii*. *Plant Mol. Biol.* 6:389-401.
- Dobzhansky T. 1978. Organismic and molecular aspect of species formation. En : *Molecular evolution*. Ayala F.J. ed. Sinauer Associated, USA. pp95-105.
- Dooley, J.J., S.P. Harrison, L.R. Mytton, M. Dye, A. Cresswell, L. Skot y J.R. Beeching. 1993. Phylogenetic grouping and identification of *Rhizobium isolates* on the basis of random amplified polymorphic DNA profile. *Can. J. Microbiol.* 39:665-673.
- Dowling D.N. y W.J. Broughton. 1986. Competition for nodulation of legumes. *Ann. Rev. Microbiol.* 40 :131-157.
- Drevon, J.J. 1983. To evaluate the nitrogenase activity of legumes nodules using acetylene reducing activity. FAO/GRET. Rome, Italy. 1/6p
- Dudman, W.F. y L. Belbin 1988. Numerical taxonomic analysis of some strains of *Rhizobium* spp that uses a qualitative coding of immunodiffusion reactions. *Appl. Environ Microbiol.* 54:1825-1830.
- Dughri, M.H., y P.J. Bottomley. 1983. Effect of acidity on the composition of an indigenous soil population of *Rhizobium trifolii* found in nodules of *Trifolium subterraneum* L. *Appl. Environ Microbiol.* 46:1207-1213.
- Dughri, M.H., y P.J. Bottomley. 1984. Soil acidity and the composition of an indigenous soil population of *Rhizobium trifolii* in nodules of different cultivars of *Trifolium subterraneum* L. *Soil Biol Biochem.* 16:405-411.
- Duque, F.F., M.C.P. Neves, A.A. Franco, R.L. Victoria y R.M. Boddey. 1985. The response of field grown *Phaseolus vulgaris* to *Rhizobium* inoculation and quantification of N₂ fixation using ¹⁵N. *Plant Soil.* 88 :333-343.
- Eaglesham, A.J., M.H. Ahmad, S. Hassouna y B.J. Goldman. 1982. Cowpea rhizobia producing dark nodules : use in competition studies. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Eaglesham, A.J. 1987. The use of intrinsic resistance for *Rhizobium* study. en : *symbiotic nitrogen fixation technology*. (Elkan ed.) Mercei Dekker. New York.
- Eardly, B.D., D.B. Hannaway y P.J. Bottomley. 1985. Characterizaation of rhizobia from ineffective alfalfa nodules : ability to nodulate bean plants *Phaseolus vulgaris* (L.) *Appl. environ. Microbiol.* 50 :1422-1427.

- Eardly, B.D, Young, J.P.W. y Selander R.K. 1992. Phylogenetic position of *Rhizobium* sp strain Or191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** :1809-1815.
- Eardly, B.D., F.-S. Wang, T.S. Whittam y R.K. Selander. 1995. Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Appl. environ. Microbiol.* **61**:507-512.
- Eckardt, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid.* **1** :584-588.
- Erlich, H.A. 1989. Basic methodology. En: *PCR Technology- Principles and applications for DNA amplification.* H. A. Erlich edi. Stockton press. USA. pp1-6
- Espinoza-Victoria, D. 1989. Caracterización de once cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia (Westerns Blot). Tesis Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillos, México.
- Espinoza-Victoria, D. F. Quezada-Pascual y R. Ferrera-Cerrato. 1989. Caracterización de diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* mediante la técnica (PAGE-SDS). II Congreso Nacional sobre Fijación Biológica de Nitrógeno. Guadalajara, Jal. México. 24-25P
- Espinoza-Victoria, D., F. Quezada-Pascual y R. Ferrera-Cerrato. 1989. Inconvenientes del uso de la técnica de ELISA convencional con propósitos de identificación de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. II Congreso Nacional sobre Fijación Biológica de Nitrógeno. Guadalajara, Jal. México. p28-29.
- Evguenicva-Hackenberg, E. y S. Selenska-Pobell. 1995. Fast identification of *Rhizobium* by PCR-RFLP analysis of part of the *rrn*-operons. International Congress of Fixation Biological of Nitrogen. Russia. p48.
- Fabiano, E. y A. Aria. 1990. Identification of inoculants strains and naturalized populations of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* using complementary methodologies. *World J. Microbiol. Biotech.* **6**:121-126.
- Fani, R., C. Bandi, M. Bazzicalupo, M.T. Ceccherini, S. Fancelli, E. Gallori, L. Gerance, Grifoni, N. Míclaus y G. Damiani. 1995. Phylogeny of the genus *Azospirillum* based on 16S rDNA sequences. *FEMS Letters.* **129**:195-200.
- FAO. 1984. Legume Inoculant and their use. FAO. Rome Italy. pp1-3
- Ferrera-Cerrato, R. 1983. Efecto de la inoculación de *Rhizobium phaseoli* en el rendimiento de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Informe No. 5 PROAF. CONACyT. Colegio de Postgraduado.

- Ferrera-Cerrato, R., J.J. Almaraz-Suárez, M.D.L.N. Rodríguez-Mendoza y D. Espinosa-Victoria. 1990. Fijación simbiótica de nitrógeno en frijol. *Terra*. 8:35-70.
- Ferrey, M.L., P.H. Graham y M.P. Russele. 1994. Nodulation efficiency of *Bradyrhizobium japonicum* strains with genotypes of soybean varying in the ability to restrict nodulation. *Can. J. Microbiol.* 40 :456-460.
- Flores M., V., González, M.A. Pardo, A. Leja, E. Martínez, D. Romero, D. Piñero, G. Dávila y R. palacios. 1988. Genomic instability in *Rhizobium phaseoli*. *J. Bacteriol.* 170 :1191-1196.
- Fried, M. 1995. Biological nitrogen fixation, present and future. En : nuclear technique in soil-plant studies for sustainable agriculture and environmental preservation. FAO/IAEA. Vienna, Austria. pp 199-204.
- García De Los Santos, A., S. Brom y D. Romero. 1996. *Rhizobium* plasmids in bacteria legume interaction. *Word J. Microbiol. Biotech.* 12 :119-125.
- George, M.L.C. y F.M. Robert. 1991. Autoregulatory response of *Phaseolus vulgaris* L. to symbiotic mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 :2687-2692.
- George, M.L.C. y F.M. Robert. 1992. Competition among *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains for nodulation of common bean. *Can. J. Microbiol.* 38:157-160.
- George T. y P.W. Singleton. 1992. Nitrogen assimilation traits and dinitrogen fixation in soybean and common bean. *Agron. J.* 84 :1020-1028.
- Giller K.E. y Cadish G. 1994. Future benefit from biological nitrogen fixation in agriculture : an ecological approach. 15° Congress International Soil Sci. Acapulco, México. pp299-304.
- Gonzalez-Cu, G. y M. Lopez-Reyes. 1989. Densidad de población de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* en la zona del estado de Veracruz. II Congreso Nacional sobre Fijación Biológica de Nitrógeno. Guadalajara, Jalisco, México. p74.
- Gordon D.M. , M. Wexler, T.B. Readon y P.J. Murphy. 1995. The genetic structure of *Rhizobium* populations. *Soil Biol. Biochem.* 27 :491-499.
- Graham, P.H. y Rosas, J.C. 1977. Growth and development of indeterminate bush and climbing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with *Rhizobium*. *J. Agric. Sci. Camb.* 88 :503-508.
- Graham, P.H. 1990. Problemas de la nodulación y fijación de nitrógeno en *Phaseolus vulgaris* L.: una reevaluación. *Terra.* 8:71-82.

- Graham P.H., M.J. Sadowsky, H.H. Keyser, Y.M. Barnet, R.S. Bradley, J.E. Cooper, D.J. De Ley, B.D.W. Jarvis, E.B. Roslycky, B.W. Strijdom y J.P.W. Young. 1991. proposed minimal standars for the description of new genera and species of root and steam nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41 :582-587.
- Grajeda-Cabrera, O.A. 1990. Cinética de la fijación de nitrógeno en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis Maestria. CINVESTAV. Unidad Irapuato. Irapuato, guanajuato, México.
- Ham, G.E., V.B. Cardwell y H.W. Johnston. 1971. Evaluation of *Rhizobium japonicum* inoculant in soil containing naturalized populations of rhizobia. *Agron. J.*63:301-303.
- Hardarson, G. y D.G. Jones. 1979. The inheritance of preference for strains of *Rhizobium trifolii* by white clover (*Trifolium repens*). *Ann. Appl. Biol.* 92:329-333.
- Hardarson, G., G.H. Heichel, C.P. Vance y D.K. Barnes. 1981. Evaluation of alfalfa and *Rhizobium meliloti* for competitiveness in nodulation and nodule effectiveness. *Crop. Sci.* 21:562-567.
- Hardarson, G. G.H. Heichel, D.K. Barnes y C.P. Vance. 1982. Rhizobial strain preference of alfalfa populations selected for characteristics associated with N₂ fixation. *Crop Sci.* 22:55-58.
- Hardarson, G., Zapata F. y Danso, S.K.A. 1984. Field evaluation of symbiotic nitrogen fixation by rhizobial using ¹⁵N methodology. *Plant Soil.* 82: 369-375.
- Hardarson, G. 1985. The use of ¹⁵N methodology to assess N₂ fixation and guidelines for improvement of N₂ fixation in grain legumes. *FAO/OIEA.* 25p
- Hardarson, G, M. Golbs y S.K.A. Danso. 1989. Nitrogen fixation in Soybean (*Glycine max* L. Merrill). as affected by nodulation patterns. *Soil Biol. Biochem.* 21:783-787.
- Hardarson, G. 1993. Methods to enhancing symbiotic nitrogen fixation. *Plant Soil.* 152:1-19.
- Hardarson, G. y S.K.A. Danso. 1993. Methods for measurement biological nitrogen fixation in grain legumes. *Plant Soil.* 152:19-23.
- Heichel, G.H., G. Hardarson, D.K. Barnes y C.P. Vance. 1984. Dinitrogen fixation, herbage yield and rhizobial preference of selected alfalfa clones. *Crop Sci.* 24:1093-1097.
- Henso , R.A. 1993. Measurement of N₂ fixation by common bean in Central Brazil as affected by different reference crops. *Plant Soil.* 152 :53-58.

- Hernández G., h. Vásquez, V. Toscano, M. Sánchez, T. Penate, A. Frachi-Alfaro, N. Mendez y J.J. Drevon. 1993. Nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars in hydroponic culture and in the field. *Trop. Agric. (trinidad)* 70 :230-234.
- Hernández-Lucas, L., L. Segovia, E. Martínez-Romero y S.G. Pueppke. 1995. Phylogenetic relationship and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 :2775-2779.
- Hofben, W.E., J.K. Jansson, B.K. Chelm y J.M. Tiedje. 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:703-711.
- Hungria, M. y Neves M.C.P. 1986a. Interacao entre cultivares de *Phaseolus vulgaris* e estirpe de *Rhizobium* na fixacao e transporte de nitrogenio. *Pes.Agrop. Bras.*21 :127-137.
- Hungria M y Neves M.C.P. 1986b. Ontogenia de ficao biologica do nitrogenio en *Phaseolus vulgaris*. *Pes.Agrop. Bras.*21 :715-730.
- Hungria, M. y Neves M.C.P. 1987. cultivar and *Rhizobium* strain effect on nitrogen fixation and transport in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant soil.* 103:111-121.
- Hungria, M. y A. Franco. 1988. Nodule senescence in *Phaseolus vulgaris* L. *Trop. Agric. (Trinidad).* 65 :341-346.
- Hunter, W.J. y Fahring C.J. 1980. Movement by *Rhizobium* and nodulation of legumes. *Soil Biol. Biochem.* 12:537-542.
- Hynes, M.F. y N.F. McGregor. 1990. Two plasmid than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Microbiol.* 4 :567-574.
- Innes R.W., P.L. Huempel, J. Pazinski, H. Canter-Cremer, B.G. Rolfe y M.A. Djordjevic. 1985. Plant factors induce expression of nodulation and host-range genes in *Rhizobium trifoli*. *Mol. Gen Genet.* 201:426-432.
- Jacoby G.A. 1994. Extrachromosomal resistance in Gram-negative organisms : the evolution of β -lactamasa. *Trens in Microbiology.* 2 :357-360.
- Jefferson R.A. , S.M. Burgess y D. Hirsh. 1986. β -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene fusion marker. *Proceedings Natl. Acad. Sci. USA.* 86 :8447-8451.
- Jefferson R.A. y K.J. Wilson. 1991. The GUS gene fusion system. En : plant molecular biology manual (S. gelvin, R. Schilperoot and D.P. Verma eds.). Kluwer Academic. Dordrecht. pp D14/1-D14/33.

- Jensen, E.S. 1986. Symbiotic N₂ fixation in pea and field bean estimated by ¹⁵N fertilizer dilution in field experiments with barley as a reference crop. *plant Soil*. 92:3-13.
- Jensen, M.A., J.A. Webster y N. Straus. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:945-952.
- Johnston, A.W.B. y J.E. Beringer. 1976. Peat root nodules containing more than one *Rhizobium* species. *Nature (London)*. 263 :611-613.
- Jones, D.G. y E.S.P. Bromfield. 1978. A study of the competitive ability of streptomycin and spectinomycin mutants of *Rhizobium trifolii* using various marker techniques. *Ann. Appl. Biol.* 88:448-450.
- Jones, D.G. y G. Hardarson. 1979. Variation within and between white clover varieties in their preference for strains of *Rhizobium trifolii*. *Ann. Appl. Biol.* 92:221-228.
- Jones, D.G. 1991. Symbiotic nitrogen fixation-exploitation an unchieved potential. *Ann. Appl. Biol.* 118 :249-259.
- Jordan , D.C. y O.N. Allen. 1984. Family Rhizobiaceae. En: *Bergey's manual of deyttrimative bacteriology*. Eight edition. (R.E. Buchanan and N.E. Gibbon editors) Williams and Wilkins. Baltimore, USA.
- Josey D.P. , J.L. Beyond, A.W.B. Johnston y J.E. Beringer. 1979. Strain identification of *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. *J. Applied Bacteriol.* 46 :343-350.
- Judd, A.K., M. Schneider, M.J. Sadowsky y F.J. De Bruijn. 1993. Use of Repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to calassify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1702-1708.
- Kajjalainen, , S. y K. Lindström. 1989. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Rhizobium galegae* strains. *J. Bacteriol.* 171:5561-566.
- Kamicker, B.J. y Brill, W.J. 1986. Identification of *Bradyrhizobium japonicum* nodules isolates from Wisconsin soybean farms. Methods to alter the recovery and nodule location of *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strains of field-grown soybeans. *Appl. Environ. Microbiol.* 51 :487-492.
- Karayan, N. y P. Woormer. 1994. Rhizobial biodiversity and population sizes in East and Southern Africa. 15th. World Crongress of Soil Science. Acapulco, México. Symposium iv b. 183p.

- Kay H.E., Coutinho H.L.C., Fattori M., Manfio G.P. Goodacre M.P., MP, Nuti M., Basaglia, y Beringer, J.E. 1994. The identification of *Bradyrhizobium japonicum* strains isolates from Italian soils. *Microbiology*. 140 :2333 -2339.
- Keyser, H.H y P.B. Cregan. 1987. Nodulation and competition for nodulation of selected soybean genotypes among *Bradyrhizobium japonicum* serogrup 123 isolates. *Appl. Environ. Microbiol* 53:2631-2635.
- Kipe-Nolt, J.A. y K.E. Giller. 1993. A field evaluation using the ¹⁵N isotopic dilution method of lines of *Phaseolus vulgaris* L. bred for increase nitrogen fixation. *Plant Soil*. 152 :107-114.
- Kishinevsky, B. y M. Bar-Joseph. 1978. *Rhizobium* strain identification in *Arachis hypogaea* nodules by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Can. J. Microbiol*. 24:1537-1543.
- Klusa, R.A., W.J. Kenworthy y D. Weber. 1986. soil temperature effect on competitiveness and growth of *Rhizobium japonicum* and on rhizobium-induced chlorosis of soybeans. *Plant Soil*. 95:201-207.
- Kremer, R.J. y H.L. Peterson. 1982. Nodulation efficiency of legume inoculation as determined by intrinsic antibiotic resistance. *Appl. Environ. Microbiol*. 43:636-642.
- Kucey, R.M.N. 1989a. Response of field bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to levels of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* inoculation in soil containing effective *R. l. bv. phaseoli* populations. *Can. J. Plant Sci*. 69:419-426.
- Kucey, R.M.N. 1989b. The influence of rate and time of mineral N application on yield and N₂ fixation by field bean. *Can. J. Plant Sci*. 69:427-236.
- Kuykendall, L.D. y D.F. Weber. 1978. Genetically marked *Rhizobium* identifiable as inoculant strains in nodule of soybean plant grown in fields populated with *Rhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol*. 36:915-919.
- Laguerre, G., M. Bardin y N. Amarger. 1993a. Isolation from soil of symbiotic and nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum* by DNA hibridization. *Can. J. Microbiol*. 39:1142-1149.
- Laguerre, G., Geniaux E., Mazurier S.L, Rodriguez-Casartelli R. y N. Amarger. 1993b. Conformity and diversity among field isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciaea*, bv. *trifolii* and bv. *phaseoli* revealed by DNA hybridization using chromosomal and plasmid probes. *Can. J. Microbiol*. 39 :412-419.
- Laguerre, G., Allard, M-L., Revoy F. y Amarger N. 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol*. 60 :56-63.

- Lalalde, R., P.C. Bigwaneza y H. Antoun. 1990. Symbiotic effectiveness of strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* isolated from soil of Rwanda. *Plant Soil*. 121:431-46.
- Lammli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature (London)*. 227 :680-685.
- Lee, S.H., D.A. Ashley y H.R. Baema. 1991. Regulation of nodule development in supernodulating mutants and wild type soybean. *Crop Sci*. 31 :688-693.
- Lehninger, A.L. 1978. *Biochemistry*. Second Ed. Worth Publishers. New York.
- Leung K., Yap K., Dashi N., y Bottomley P.J. 1994a. Serological and ecological characteristic of a nodule-dominant serotype from an indigenous soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 :408-415.
- Leung, K., Strain, S.R., De Bruijn F.J. y Bottomley P.J. 1994b. Genotypic and phenotypic comparison of chromosomal types within an indigenous soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 :416-426.
- Leung, K., Wahajage F.N. y Bottomley P.J. 1994c. Symbiotic characteristics of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolates which represent major and minor nodule-occupancy chromosomal types of field-grown subclover (*Trifolium subterraneum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 60 :427-433.
- Lie, T.A. y P.C.J.M. Timmermans. 1983. Host-genetic control of nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis: complication in the genetic analysis due to maternal effect. *Plant Soil*. 75:449-453.
- Lie, T.A. 1984. Host genes in *Pisum sativum* L. conferring resistance to European *Rhizobium leguminosarum* strains. *Plant Soil*. 82:415-425.
- Lincoln, R.J., G.A. Boxshall y P.F. Clark. 1995. *Diccionario de ecología, evolución y taxonomía*. Fondo de Cultura Económica. México.
- Lohrke, S.M., J.H. Orf, E. Martínez-Romero y M.J. Sadowsky. 1995. Host controlled restriction of nodulation by *Bradyrhizobium japonicum* strains in serogroup 110. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 :2378-2383.
- López-Alcocer, E., R. Ferrera-Cerrato y R. Lépiz-Ildelfonso. 1989. Programa de mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). I. Identificación de genotipos de frijol con alta capacidad en la fijación simbiótica de nitrógeno. I Congreso Nacional de Fijación Biológica de Nitrógeno. Xalapa, Ver. p.14.

- Lwdwing, W. y K.H. Schleifer. 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23 S rRNA sequences analysis. *FEMS Microbiology Reviews*. 15 :155-173.
- Lunge, V.R., N. Ikuta, A.S.K. Fonseca, D. Hirigoyen, M. Stoll, S. Bonatto y L.S. Ozaki 1994. Identification and inter-relationship analysis of *Bradyrhizobium japonicum* strains by restriction fragment lenght polymorphism (RFLP) and random amplified polymorphic DNA (RAPD). *World J. Microbiol. Biotech.* 10 .648-652.
- Lupsky, J.R. y G.M. Weinstock. 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.* 174:4525-4529.
- McNeely, J.A., K.R. Miller, W.V. Reid, R.A. Mittermeir y T.B. Werner. 1990. Conserveing the word's biological diversity. Word. Bank. Washington.
- Mahon, J.D. 1977. Respiration and the energy requirements for nitrogen fixation in nodulated pea roots. *Plant Physiol.* 60 :817-821.
- Manrique, A., Manrique K. Y J. Nakahodo. 1993. Yield and biological nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Peru. *Plant Soil.* 152 :87-91.
- Marques-Pinto, C., P.Y. Yao y J.M. Vincent. 1974. Nodulating competitiveness among strains of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium trifolii*. *Austr. J. Agric. Res.* 25 :317-329.
- Martínez, E., Romero D. y Palacios R. 1990. The Rhizobium genome. *CRC Critical Review Plant Sci.* 9 :59-93
- Martínez-Romero, E., M. Flores, S. Brom, D. Romero, G. Dávila y R. Palacios. 1988. *Rhizobium phaseoli*. a molecular genetic view. *Plant Soil.* 108:179-184.
- Martínez-Romero, E. y M. Rosenblueth. 1990. Increased bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulation competiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2384-2388.
- Martínez-Romero, E., F. Segovia, F. Martins-Mercante, A.A. Franco, P. Graham y M.A. Pardo. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp trees. *Intr. J. Syst. Bacteriol.* 41:417-426.
- Martínez-Romero, E. 1994. Recient developments in *Rhizobium* taxonomy. *Plant Soil.* 161 :11-20.
- Mathieu, B.M.L. 1982. Estudio rizosférico del frijol *Phaseolus vulgaris* L. inoculado con mutantes de *Rhizobium phaseoli* resistentes a estreptomicina. tesis Profesional. IPN. México.

- Mercado-Blanco J. y N. Toro. 1996. Plasmid in rhizobia : the role of nonsymbiotic plasmids. *Mol. Plant Microbe Interactions*, 7 :535-545.
- Meade, J., P. Higgins y F. O'Gara. 1985. Studies on inoculation and competitiveness of a *Rhizobium leguminosarum* strains in soil containing indigenous rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:899-903.
- Mellor, R.B. 1994. The nodulation of legumes. Copenhagen. Dr. Agron. Thesis.
- Mendoza-Gamboa, R. 1987. Caracterización de cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum* y efecto de su inoculación en lenteja (*Lens sculenta* M.). Tesis de Licenciatura. Escuela de Agronomía y Zootecnia, Universidad de Guanajuato. Irapuato, Guanajuato, México.
- Michiels J. y J. Vanderleyen. 1994. Molecular basis of the establishment and functioning of a N_2 -fixing root nodule. *World J. Microbiol. Biotech.* 10 :612-630.
- Miranda, C. 1967. Origen del *Phaseolus vulgaris* (frijol común). *Agrociencia*. 2 :99-109.
- Miranda, B.D. y F.A. Bliss. 1991. Selection for increased seed nitrogen accumulation in common bean: implication for improving dinitrogen fixation and seed yield. *Plant Breeding*. 106:301-311.
- Moawad, H., W.R. Ellis y E.L. Schmidt. 1984. Rhizosphere response as a factor in competition among three serogroups of indigenous *Rhizobium japonicum* for nodulation in field-grown soybean. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:607-612.
- Moawad, H., y Beck, D.P. 1991. Some characteristics of *Rhizobium leguminosarum* isolates from inoculated field-grown lentil. *Soil Biol. Biochem.* 23 :933-937.
- Molina-García, O. 1975. Efecto de la fertilización nitrogenada sobre algunos componentes fisiológicos del rendimiento y el contenido de N en la planta en 6 variedades de frijol. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.
- Moxley, J.C., D.J. Hume y D.L. Smith. 1986. N_2 fixation and competitiveness of *Rhizobium phaseoli* strains isolated from Ontario soils. *Can. J. Plant Sci.* 66:825-836.
- Mullis, K.B. y F. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155:335-350.
- Muñoz, R.J.J., M.M.P. Arrieta, R.J.Z. Catellanos, R.J.S. Padilla y P.H. Graham. 1989. Efecto de la competencia de las cepas nativas sobre la nodulación y rendimiento de frijol bajo temporal. En: informe de investigación sobre frijol. 1988. SARH. INIFAP. Durango, Dgo. pp210-213.

- Neves, M.C y Hungria, M. 1987. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 3 :267-321.
- Nick, G. y K. Lindström. 1994. Use of repetitive sequence and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomic DNA of *Rhizobium galegae* strains and to identify the DNA obtained by sonicating the liquid cultures and root nodules. *Syst. Appl. Microbiol.* 17:265-273.
- Nick, G., D. Brion, W. Jarvis, S.W. Tighe y K. Lindström. 1995. Taxonomy of rhizobia isolated from the root nodules of leguminous trees in Sudan. *Third. International Congress of Nitrogen Fixation. St. Petersburg, Rusia.* p. 57.
- Nutman, P.S. 1984. Improving nitrogen fixation in legumes by plant breeding ; the relevance of the host selection experiments in red clover (*Trifolium pratense* L.) and subterranean clover (*T. subterraneum* L.). *Plant Soil.* 82 :285-301.
- Obaton, M. 1983. General information on nitrogen fixing symbiosis *Rhizobium*-legume. *FAO/GRET.* 1/4p.
- Ochoa-Márquez, R., J.A. Acosta-Gallegos, H. Pérez-Trujillo, D.M. Aguilera-Charles, S. Núñez-González y P. Fernández-Hernández. 1990. Estabilidad de rendimientos de variedades de frijol en la región semiárida de México. En : resultados de investigación sobre frijol 1989. *SARH. INIFAP. Durango, Dgo.* pp15-32.
- Olalde-Portugal, V. 1986. Comportamiento Ecológico de las cepas nativas de *Rhizobium meliloti*. Tesis Doctoral. *CINVESTAV-Unidad Irapuato. Irapuato, Gto.*
- Olalde-Portugal, V. y J.J. Peña-Cabriales. 1989. Poblaciones nativas de *Rhizobium meliloti* en el bajo, México. II. competencia saprofítica. *Rev. Latinoamer. Microbiol.* 31 :285-291.
- Olsen P.E. y W.A. Rice. 1984. Minimal antigenic characterization of eight *Rhizobium meliloti* strains by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Can. J. Microbiol.* 30:1093-1099.
- Olsen P.E., W.A. Rice, G.W. Stemke y W.S. Page. 1983. Strain-specific serological technique for the identification of *Rhizobium meliloti* in comercial alfalfa inoculants. *Can. J. Microbiol.* 29:225-230.
- Pacovsky, R.S., H.G. Bayne y G.J. Bethlenfalvay. 1984. Symbiotic interaction between strains of *Rhizobium phaseoli* and cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. *Crop Sci.* 24:101-105.
- Padilla-Rámirez, S. 1989. Efecto del acolchado en la nodulación del frijol bajo condiciones de temporal. II Congreso Nacional de Fijación Simbiótica de Nitrógeno. *Guadalajara, Jal.* pp84-85.

- Padilla-Rámirez, S., H. Pérez-Trujillo, J.A. Acosta-Gallegos y R. Ferrera-Cerrato. 1990. Interacción simbiótica entre cepas de *Rhizobium* y cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris*) bajo condiciones de temporal. En : resultados de investigación sobre frijol 1989. SARH, INIFAP. Durango, Dgo. pp95-102.
- Pankhurst, C.E., P.E. McDonald y J.M. Reeves. 1986. Enhance nitrogen fixation and competitiveness for nodulation of *Lotus pedunculatus* by a plasmid-cured derivative of *Rhizobium loti*. J. Gen. Microbiol. 132:2321-2328.
- Pastorini, D. 1992. Métodos de identificación de rizobios. ALAR. 16 :12-20.
- Peña-Cabriales, J.J. y Castellanos, J. Z.. 1993. Effect of water stress on N₂ fixation and grain yield of *Phaseolus vulgaris* L. Plant Soil. 152 :151-155.
- Peña-Cabriales, J.J. Grageda-Cabrera, O.A., Kola, V. y Hardarson G. 1993. Time course of N₂ fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Soil. 152 :115-121.
- People, M-B., Herridge, D.F. and Ladha, J.K. 1995. Biological nitrogen fixation : An efficient source of nitrogen for sustainable agriculture production ? Plant Soil. 174 :3-28.
- Pereira, P.A.A., R.H. Burris y F.A. Bliss. 1989. ¹⁵N determined dinitrogen fixation potential of genetically diverse bean lines (*Phaseolus vulgaris* L.) Plant Soil. 120:171-179.
- Pereira, P.A.A., B.D. Miranda, J.R. Attewell, K.A. Kmiec y F.A. Bliss. 1993. Selection for increased nodule number in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Soil. 148 :203-209.
- Pessanha, G.G., A.A. Franco, J. Doberieuer, A. Crossman y D.P.P. Souza-Britto De. 1972. Correlacao negativa da nodulacao coma producao de feijao (*Phaseolus vulgaris* L.) en solos ond3e nitrogenio nao e fator limitante. Pes- Agrop. Brasi. Ser. Agron. 7 :49-56.
- Phillips, D.A. 1980. Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes. Ann. Rev. Plant Physiol. 31 :29-49.
- Picard, C., Ponsounet C., Paget, E., Nesme, X. y Simonet P. 1992. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 58 :2717-2722.
- Piha, M.J. y Muns, D.N. 1987a. Nitrogen fixation potential of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) compared with other grain legumes under controlled conditions. Plant Soil. 98 :169-182.
- Piha, M.J. y Muns, D.N. 1987b. Nitrogen fixation capacity of field-grown bean compared to other grain legumes. Agron. J. 79 :690-696.

- Pillai, S.D., K.L. Josephson, R.L. Bailey y I.L. Pepper. 1992. Specific detection of rhizobia in root nodules and soil using the polymerase chain reaction. *Soil Biol. Biochem.* 24: 885-889.
- Pineda, P. y J. Kipe-Nolt. 1990. Response of bean varieties to inoculation with selected *Rhizobium* strains in El Salvador. Turrialba. .
- Piñero, D., Martínez, E. y Selander R.K. 1988. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 :2825-2832.
- Pooyan S., M.L.C. George y D. Borthakur. 1994. Characterization of a *Rhizobium etli* chromosomal gene required for nodule development on *Phaseolus vulgaris* L. *World J. Microbiol. Biotech.* 10 :583-589.
- Pracht, J.E., C.D. Nickell, J.E. Harper y D.G. Bullock. 1994. Agronomic evaluation of non-nodulating and hypernodulating mutant soybean. *Crop Sci.* 34:738-740.
- Prost, E. y D. Larsul. 1989. The polymerase chain reaction and its applications. *Meth. Mol. Cellular Biology.* 1:45-51.
- Quintero J.M., S.M. González, C. Calzada, M.A. Castillo y M. Peña. 1983. Efecto de la inoculación en frijol en zonas de temporal en Durango. Turrialba. 33:303-309.
- Quinto, C., Vega, H., Flores M., Leemans, J., Cevallos, M.A., Pardo, M.A., Azpiros M., Girard, M.L., Calva, E. y Palacios, R. 1982. Nitrogenase reductase : a functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82 :1170-1174.
- Ramos, M.L.G y R.M. Boddey. 1987. Yield and nodulation of *Phaseolus vulgaris* and the competitiveness of an introduced *Rhizobium* strains: effect of lime, mulch and repeated cropping. *Soil Biol. Biochem.* 19:171-177.
- Ramos, M.L.G., F. Nilo, M. Magalhaes y R.M. Boddey. 1987. Native and inoculated rhizobia isolated from field grown *Phaseolus vulgaris* effects of liming and soil acid on antibiotic resistance. *Soil Biol. Biochem.* 19:179-185.
- Rashit, E. y Bazin, M. 1987. Environmental fluctuation, productivity, and species diversity : an experimental study. *Microbial Ecol.* 14 :101-112.
- Reichardt, K., G. Hardarson, F. Zapata, C. Kirda y S.K.A. Danso. 1987. Site variability effect on field measurement of symbiotic nitrogen fixation using the ¹⁵N isotope dilution method. *Soil Biol. Biochem.* 19:405-409.
- Rennie, R.I. 1982. Quantifying dinitrogen (N₂) fixation in soybeans plants ¹⁵N isotope dilution: the question of nonfixing control plant. *Can. J. Bot.* 60:856-861.

- Rennie, R.J. y G.A. Kemp. 1983a. N₂ fixation in field beans quantified by ¹⁵N isotope dilution. I. Effect of strains of *Rhizobium phaseoli*. *Agron J.* 75:640-644.
- Rennie, R.J. y G.A. Kemp. 1983b. N₂ fixation in field beans quantified by ¹⁵N isotope dilution. II. Effect of cultivars of beans. *Agron. J.* 75:645-649.
- Richardson, A.E., L.A. Viccars, J.M. Watson y A.H. Gibson. 1995. Differentiation of *Rhizobium* strains using the polymerase chain reaction with random and directed primers. *Soil Biol. Biochem.* 27:515-524.
- Robert, G.P. y Brill, W.J. 1981. Genetics and regulation of nitrogen fixation. *Ann. Rev. Microbiol.* 35:207-235.
- Robert, F.M. y Schmidt E.L. 1983. Population changes and persistence of *Rhizobium phaseoli* in soil and rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:550-556.
- Robles-Pérez, C., P. Pacheco-Acevedo y E. Arcocha-Gómez. 1989. Eficiencia simbiótica de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseolien* dos variedades regionales de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Oaxaca. II Congreso Nacional Sobre Fijación Biológica de Nitrógeno. Guadalajara, Jalisco, México. 88-89p
- Romero, D., Singleton, P.W., Segovia, L., Morett, E., Bohlool, B.B., Palacios, R. y Dávila, G. 1980. Effecto of naturally occurring nif reiterations on symbiotic effectiveness in *Rhizobium phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:846-850.
- Rosas J.C. y F.A. Bliss. 1986. Host plant traits associated with estimates of nodulation and nitrogen fixation in common bean. *Hort Sci.* 21:287-289.
- Ruschel, A.P. y R. Ruschel. 1975. Evaluation of nitrogen fixation in bean (*Phaseolus vulgaris*). *Pesquis Agrop. Bras.* 10:11-17.
- Ruschel A.B., P.B. Vose, E. Matsui, R.L. Victoria, S.M.T. Saito. 1982. Field evaluations of nitrogen fixation and nitrogen utilization by *Phaseolus vulgaris* bean varieties determined by nitrogen-15 isotope dilution. *Plant Soil.* 65:397-408.
- Sadowsky, M.J., E.T. Raymond, P.B. Cregan y H.H. Keyser. 1987. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* serogroup 123 and its relation to genotype-specific nodulation of soybean. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2624-2630.
- Sadowsky, M.J., P.B. Cregan y H.H. Keyser. 1988. Nodulation and nitrogen fixation efficiency of *Rhizobium fredii* with *Phaseolus vulgaris* genotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1907-1910.
- Sadowsky, M.J., P.B. Cregan, M. Gottfert, A. Sharma, D. Gerhold, F. Rodríguez-Quimones, H.H. Keyser, H. Hennecke y G. Stacer. 1991. The *Bradyrhizobium japonicum* *nolA* gene and

its involment in the genotype specific nodulation of soybean. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:637-641.

- Sadowsky, M.J. y P.B. Cregan. 1992. The soybean Rj4 allele restriction nodulation by bradyrhizobium japonicum serogroup 123 strains. Appl. Environ. Microbiol. 58:720-723.
- Sadowsky, M.J.; R.M. Kosslack, C.J. Madrzak, B. Golinska y P.B. Cregan. 1995. Restriction of nodulation by *Bradyrhizobium japonicum* is mediated by factor present in the root of *Glycine max*. Appl. Environ. Microbiol. 61:832-836.
- Sadowsky, M.J. y H.A. Mowad. 1995. The use of repPCR DNA fingerprinting to among genetically and serologically-related *Bradyrhizobium japonicum* straius. Third International Congress of Nitrogen Fixation. St. Petersburg, Russia. p 440.
- SAGAR, 1995. Producción y comercialización de frijol 1987-1993. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. México.
- Saito, S.M.T., Matsuli, E. y Salati, E. 1980. $^{15}\text{N}_2$ fixation, H_2 evolution and C_2H_2 reduction relationships in *Phaseolus vulgaris*. Pesq. Agrop. Bras. 21 :715-730.
- Saito, S.M.T., M.N.S. Montanheiro, R.L. Victoria y K. Recharadt. 1984. The effect of N fertilizer and soil moisture on the nodulation and graowth of *Phaseolus vulgaris*. J. Agric. Sci. Camb. 103:87-97.
- Sanchez, F. 1985. Fijación simbiótica de nitrógeno: bioquímica, biología molecular y perspectivas de la ingeniería genética. En: Perspectivas de la biotecnología en México. Fondo Javier Barros Sierra. México. pp. 413-433.
- Sargent L., S.Z. Huang, B.G. Rolfe y M.A. Djordjevic. 1987. Split-root assay *Trifolium subterraneum* show that *Rhizobium* infection induction induces a systemic response that can inhibit nodulation of another invasive *Rhizobium* strain. Appl. Environ. Microbiol. 53:1611-1619.
- Schleifer, K.H. y W. Ludwig. 1994. Molecular taxonomy: classification and identification. En: Bacterial duversity and systematic. Ba-Prost, F.G. Edit. Plenum Press. New York, USA. pp 1-15.
- Schmidt, T.M. 1994. Fingerprint bacterial genomes usong ribosomal RNA genes and operons. Meth. Mol. Cellular Biology. 5:3-12.
- Schofield, P.R., R.W. Ridge, B.G. Rolfe, J. Shine y J. Watson. 1984. Host-specific nodulation is encoded on 14 Kb DNA fragment in *Rhizobium trifolii*. Plant Mol. Biol. 3:3-11.

- Schofield, P.R., Gibson, A.H., Dudman, W.F. y Watson J.M. 1987. Evidence for genetic exchange and recombination of *Rhizobium* symbiotic plasmid in a soil population. *Appl. Environ Microbiol.* 53 :2942-2947.
- Schubert, K.R. y Evans, H.J. 1976. Hydrogen evolution a major factor affecting nitrogen fixation in nodulated symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73 :12207-1211.
- Schultze M. y A. Kondorosi. 1995. What makes nodulation signals host-plant specific?. *Trends in Microbiology.* 3:370-372.
- Segovia, L. D. Piñero; R. Palacios y E. Martínez-Romero. 1991. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:426- 433.
- Segovia, L., J.P.V., young y E. Martínez-Romero. 1993. Reclassification of american *Rhizobium leguminosarium* bv. *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 43:373-37
- Selander, P.K. 1978. Genetic variation in natural populations. En: *Molecular evolution.* (Ayala De.). Sinauer Associated. USA. pp21-59.
- Selander, R.E., Cauganth D.A., Ochman, H., Musser J.M. Gilmour, M.N. y Whittam, T.S. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematic. *Appl. Environ. Microbiol.* 51 :873-884.
- Selenska-Pobell, S., S. Evagvenieva-Hackenberg y L. Huber. 1995. Molecular techniques for detection and identification of *Rhizobium* in soil inoculation and nodule-samples. *Third International Congress of Nitrogen Fixation.* St. Petersburg. p 460.
- Sessitsch A., P.K. Jemba, G. Hardarson, A.D.L. Akkermans y K. Wilson. 1996a. Measurement of the competitiveness index of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 derivatives marked with the *gusA* gene. Submitted to *Soil Biol. Biochem.*
- Sessitsch A., G. Hardarson, A.D.L. Akkermans y M. de Vos. 1996b. Characterization of *Rhizobium tropici* and other *Rhizobium spp* that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. in an Australian soil. Submitted to *Molecular Ecology.*
- Singlenton, P.W. y D. Sainsbury. 1981. *Dictionary of microbiology.* John Wileyand Sons. New York.
- Singlenton, P.W. y J.W. Tavares. 1986. Inoculation response of legumes in relation to the number and effectiveness of indigenous *Rhizobium* populations. *Appl. environ. Microbiol.* 51:1013-1018.

- Smit, B.E. et al 1987. Biochemistry of nitrogenase and the physiology of related metabolism. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B317:131-146.
- So, R.B., J.K. Ladha y J.P.W. Young. 1994. Photosynthetic symbionts of *Aschynomone* spp. form cluster with *Bradyrhizobium* on the basis of fatty acid and rRNA analyses. Int. J. Syst. Bacteriol. 44:392-403.
- Somasegaran, P. y B.B., Bohlool. 1990. Single-Strain versus multistrains inoculation: effect of soil mineral N availability on rhizobial strain effectiveness and competition for nodulation on chick-pea, soybean, and dry bean. Appl. Environ. Microbiol. 56:3298-3303.
- Somasegaran, P. y Hobell, H.J. 1985. Methods in Legume-*Rhizobium* technology. NifTal Hawaii. USA.
- Somasegaran, P., Hoben H.J. y Gurgun, V. 1988. Effects of inoculation rate, rhizobial strain competition and nitrogen fixation in chickpea. Agron. J. 80 :68-73.
- Sombroack, W.G. 1994. Soils and biodiversity. 15th. World Congress of Soil Science. Acapulco, México. pp. 165-167.
- Souza, V. 1990. Genética y ecología de poblaciones en *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli asociadas a *Phaseolus vulgaris* y a *Phaseolus coccineus* silvestres y cultivados, en Morelos, México. Tesis Doctoral. UNAM, México.
- Souza, V., Eguiarte, L., Avila G., Capello, R. Gallardo, C., Montoya J. y Piñero D. 1994. Genetic structure of *Rhizobium etli* bv phaseoli associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, México. Appl. Environ. Microbiol. 60 :1260-1268.
- Sprent J.I. y Raven J.A. 1985. Evolution of nitrogen-fixing symbiosis. Proceeding Royal Society of Edimburg. 85B :215-237.
- St Clair, D.A., Wolyn, J.J., Dubois, J., Burris, R.H., y Bliss F.A. 1988. Field comparison of nitrogen fixation determined with nitrogen-15-depleted and nitrogen-15-enriched ammonium sulfate in selected inbred backcross lines of common bean. Crop Sci. 26 :773-778.
- Stein, M., E.S.P. Bromfield y M. Dye. 1982. As assessment of a method based on intrinsic antibiotic resistance for identifying *Rhizobium* strains. Ann. Appl. Biol. 101:261-267.
- Strain, S., R. Leung, T.S. Whittam, F.J. De Bruijn y P.J. Bottomley. 1994. Genetic structure of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii and viciae populations found in two soil under different plant communities. Appl. Environ. Microbiol. 60:2772-2778.

- Streit W., L. Botero, D. Werner y D. Beck. 1995. Competition for nodule occupancy on *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* and *Rhizobium tropici* strains can be efficiently monitored in an ultisol during the early stages of growth using a constitutive GUS gene fusion. *Soil Biol. Biochem.* 27:1075-1081.
- Subba-Rao, N.S. 1983. Chemical and biologically fixed nitrogen-potential and prospective. En: *Recent advance in biological nitrogen fixation*. Subba-Rao, N.S. De. United State of America.
- Svenning, M.M., M. Johannessen, B. Solheim y T.V. Bhuvanawari. 1995. Identification of *Rhizobium* by use of REP-PCR on white clover nodules. *Third International Congress of Nitrogen Fixation*. St. Petersburg, Russia. p.495.
- Taboada, H., S. Encarnación, S. Vargas, M.C. Mora y E. Martínez-Romero. 1996. Glutamine synthetase II constitutes a novel taxonomic marker in *Rhizobium etli* and other *Rhizobium* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:485-491.
- Tas, E., A. Saeno, P. Leimonen y K. Lindström. 1995. Identification of *Rhizobium* spp. in peat-based inoculants by DNA hybridization and PCR and its application in inoculant quality control. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1822-1827.
- Tas, E., P. Leinonen, A. Saano, L.A. Räsänen, S. Kaijalainen, S. Piippola, S. Hakola y K. Lindstrom. 1996. Assessment of competitiveness of rhizobia infecting *Galega orientalis* on the basis of plant yield nodulation, and strain identification by antibiotic resistance and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:529-535.
- Thies, J.E., P.W. Singleton y B.B. Bohlool. 1991. Influence of the size of indigenous rhizobial population on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia of field-grown legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:19-28.
- Thies, J.E., P.W. Singleton y B.B. Bohlool. 1992. Environmental effects of competition for nodule occupancy between introduced and indigenous rhizobia and among introduced strains. *Can. J. Microbiol.* 39:493-500.
- Thurman, N.P. y E.S.P. Bromfield. 1988. Effect of variation within and between *Medicago* and *Mellilotus* species on the composition and dynamic of indigenous populations of *Rhizobium meliloti*. *Soil Biol. Biochem.* 20:31-38.
- Toro, N. y J. Olivares. 1986. Characterization of a large plasmid of *Rhizobium meliloti* involved in enhancing nodulation. *Mol. Gen. Genet.* 202:331-335.
- Triplett E.W. y T.M. Barta. 1987. Trifolixin production and nodulation are necessary for the expression of superior nodulation competitiveness by *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* T24 on clover. *Plant Physiol.* 85:335-342.

- Triplett E.W. y Sadowsky, M.S. 1992. Genetic of competition for nodulation legumes. *Annu. Rev. Microbiol.* **46** :399-428.
- Tsai, S.M., P.M. Da Silva, W.L. Cabezas y R. Bonnetti. 1993. Variability in nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) intercropped with maize. *Plant Soil.* **152**:3-101.
- Tsushima, S., A. Hase, Y. Komoto, J.P. Carter, K. Miyashita, K. Yokoyama y R.W. Pickup. 1995. Detection of genetically engineered microorganisms in paddy soil using a simple and rapid "nested" polymerase chain reaction method. *Soil Biol. Biochem.* **27**:219-227.
- Turco, R.F., T.B. Norman y D.F. Bezdicek. 1986. Effectiveness and competitiveness of spontaneous antibiotic-resistant mutant of *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium japonicum*. *Soil Biol. Biochem.* **18**:259-262.
- Ueda, T., Y. Suga, N. Yahito y T. Matsuguchi. 1995. Phylogeny of sym plasmids of rhizobia by PCR-based sequencing of a *nodC* segment. *J. Bacteriol.* **177**:468-472.
- Urban, J. 1988. Use of succinate-sensitive inoculants increases nodule number and seed yield in legumes. In: Nitrogen fixation hundred year after. H. Bothe, F.J. de Bruijn and W.E. Newton (ed.). Gustav Fischer Verlag, New York. p566.
- Ursing, J.B., R.A. Rosello-Mora, E. Garcia-Valdés y J. Lalucat. 1995. taxonomic note: a pragmatic approach to the nomenclature of phenotypically similar genomic groups. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:604.
- Valdés, M. y H.H. Hubell. (1974) Fertilizantes naturales para las plantas leguminosas (inoculación). COFAA, DEDICT. Instituto Politécnico Nacional. 2-14pp
- Van Elsas, J.D. y C. Waalwijk. 1991. Method for the detection of specific bacteria and their genes in soil. *Agriculture Ecosys. Environ.* **34**:97-105.
- Van Rensburg, H.J. y B.D. Strijdom. 1985. Effectiveness of *Rhizobium* strains used in inoculants after their introduction into soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:127- 131.
- Van Rossum, D., F.P. Schuurman, M. Gillis, A. Muyotcka, H.W. Van Verseveld, A.H. Stouthammer y F.C. Boogerd. 1995. Genetic and phenetic analyses of *Bradyrhizobium* strains nodulation peanut (*Arachys hypogaea* L.) roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1599-1609.
- Vance, C.P. 1983. *Rhizobium* infection and nodulation: a beneficial plant disease?. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**:399-424.
- Veal, D.E., H.W. Stokes y G. Daggard. 1992. Genetic exchange in natural microbial communities. *Adv. Microbial Ecol.* **12**:383-430.

- Vega-Segovia, M.L. 1990. Estudios de competencia de diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* provenientes de zonas áridas de México. Tesis de Licenciatura. UNAM. México.
- Versaloric, J., M. Schneider, F.J. De Bruijn y J.R. Lupski. 1994. Genomic fingerprint of bacterial using repetitive sequences based polymerase chain reaction. *Meth. Mol. Cellular Biology*. 5:25-40.
- Vessey, J.K. 1994. Measurement of nitrogenase activity in legume root nodule: in defense of the acetylene reduction assay. *Plant Soil*. 158:163-167.
- Vincent, J.M. 1975. Manual práctico de rizobiología. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.
- Wadisirisuk, P. S.K.A. Danso, G. Hardarson y G.D. Bowen. 1989. Influence of *Bradyrhizobium japonicum* location and movimient on nodulation and nitrogen fixation in soybean. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:19-28.
- Wani, S.P. Rupela O.P. y Lee, K.K. 1995. Sustainable agriculture in the semi-arid tropics biological nitrogen fixation in grain legumes. *Plant Soil*. 174 :20-49.
- Weaver, R.W. y L.R. Frederick. 1974a. Effect of the inoculation rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merrill I. Greenhouse studies. *Agron. J.* 66:229-232.
- Weaver, R.W. y L.R. Frederick. 1974b. Effect of the inoculation rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merrill II. Field studies. *Agron. J.* 66:233-236.
- Weaver, R.W. y S.F. Wright. 1987. Variability in effectiveness of rhizobia during culture an nodules. *Appl. environ. Microbiol.* 53:2972-2974.
- Weaver, R.W. D. Sen, J.J. Coll, C.R. Dixon y G.R. Smith. 1989. Specificity of arrowleaf clover rhizobia and its establishment on soil from crimson clover pastures. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 53:731-734.
- Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier y D.J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697-703.
- Weiser, G.C., K.F. Grafton y D.L. Berryhill. 1985. Nodulation of dry beans by comercial and indigenous strains of *Rhizobium phaseoli*. *Agron. J.* 77:856-859.
- Wery , J. y Grignac, P. 1995 Características biológicas y agrícolas de las leguminosas. En : Manual técnico de la fijación biológica de nitrógeno. OEA/FAO. Roma, pp 1/3.
- Westerman D.T. , L.K. Porter y W.A. O'Deen 1985. Nitrogen partition and mobilization patterns in bean plants. *Crop Sci.* 25:225-229.

- Wheatcroft, R., D.G. McRae y R.W. Miller. 1990. Changes in the *Rhizobium meliloti* genome and the ability to detect supercoiled plasmid during bacteroid development. *Mol. Plant Microbe Inter.* **3**:9-17.
- Wilson K. J., K.E. Giller y R.A. Jefferson. 1991. β -glucuronidase (GUS) operon fusion as a tool for studying plant-microbe interaction. En: *Advances Mol. Gen. Plant Microbe Inter.* (F. Hennecke y D.P.S. Verma eds.) Kluwer Academic. Dordrecht. I:226-229.
- Wilson K. J., A. Sessitsch, J.C. Carbo, K.E. Giller, A.D.L. Akkermans y R.A. Jefferson. 1995. β -glucuronidase (GUS) transposon for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Microbiology.* **141**:1691-1705.
- Wilson K. J. 1995. Molecular techniques for the study of rhizobial ecology in the field. *Soil Biol. Biochem.* **27**:501-514.
- Willems A. y M.D. Collins. 1993. Phylogenetic analysis of rhizobia and *Agrobacterium* based 16S rRNA gene sequence. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:305-313.
- Wolyn, D.J., D.A. St Clair, J. Du Bois, J.C., Rosas, R.H. Burris, F.A. Bliss. 1991. Distribution of nitrogen in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes selected for differences in nitrogen fixation ability. *Plant Soil.* **138**:303-311.
- Wong, F. Y.K., E. Stackebrandt, J.K. Ladha, D.E. Fleischman, R.A. Date y J.A. Fuerst. 1994. Phylogenetic analysis of *Bradyrhizobium japonicum* and photosynthetic stem-nodulating bacteria from *Aeschynomene* species grown in separated geographically regions. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:940-946.
- Wose, C.R., O. Kandler y M.L. Wheelis. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains archae, bacteria and eucarya. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **87**:4576-4579.
- Young, J.P.W. 1985. *Rhizobium* populations genetic: enzyme polymorphism in isolates from pea, clover, beans, and lucerne grown at the same site. *J. Gen. Microbiol.* **131**:2399-2408.
- Young, J.P.W., H.L. Dowler y B.D. Eardly. 1991. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* BTAil by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA segment. *J. Bacteriol.* **17**:2271-2277.
- Young, J.P.W. 1994. All those new names: an overview of the molecular phylogeny of plant associated bacteria. *Advances Mol. Gen. Genet Plant Microbe Int.* **3**:73-80.
- Zahran, H.H. 1995. Characteristic of Rhizobia isolated from wild herb legumes of the Egyptian desert. Third International Congress of Nitrogen Fixation. St. Petersburg. Russia. p431.

Zang, X., G. Nock, S. Kajjalainen, C. Lönnquist, E. Tas, S.W. Tighe, P.H. Graham y K. Lindstöm. 1995. Diversity of peanut bradyrhizobia from China. Third International Congress of Nitrogen Fixation .St. Petersburg. Russia. p 445.

Zvyagintsev, D.G. 1994. Biodiversity of microorganisms in different soil types. 15° World Congress of Soil Science. Acapulco México. 184-185p.

ANEXO

Artículo aceptado para su publicación en el libro: *Molecular Biology in Soil Microbial Ecology* edited by Gudni Hardarson and William Broughton, en el capítulo 16 y titulado: *Nitrogen fixation and nodule occupancy by native strains of Rhizobium spp. on different cultivars of Phaseolus vulgaris* by J. Vázquez-Arroyo, J.J. Peña-Cabriales, A. Sessitsch, and E. Martínez-Romero.



JOINT FAO/IAEA DIVISION
OF NUCLEAR TECHNIQUES IN FOOD AND AGRICULTURE



INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY
FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS

WAGRAMERSTRASSE 5, P.O. BOX 100, A-1400 VIENNA, AUSTRIA
TELEX: 1-12643, CABLE: INATOM VIENNA, FACSIMILE: (+43 1) 20607, TELEPHONE: (+43 1) 2060

IN REPLY PLEASE REFER TO:

DIAL DIRECTLY TO EXTENSION:

Dr. J.J. Pena-Cabriaes,
Centro de Investigacion y Estudios Avanzados,
Instituto Politecnico Nacional,
Unidad Irapuato, Apdo. Postal 629,
Irapuato, Gto. Mexico.

Dear Dr. Pena-Cabriaes,

As you will see, we are in the final stages of processing the book which resulted from the co-ordinated research on *Enhancing Soil Fertility and Crop Production by Better Management of Rhizobium*. Your manuscript entitled:

16. Nitrogen fixation and nodule occupancy by native strains of *Rhizobium* spp. on different cultivars of *Phaseolus vulgaris* by J. Vasquez, J.J. Pena-Cabriaes, A. Sessitsch, and E. Martinez-Romero

has been edited as shown on the manuscript. In general, we feel that you have made a very worthwhile contribution to the programme and that your data are very solid. With some additional inputs, this could become a very fine paper. In particular, we would like to ask you to strictly follow the Instructions to Authors for Plant & Soil, and to seriously consider adding a Discussion. After all, you have a lot of interesting information, some of which is not adequately discussed (e.g. the lack of diversity amongst the rhizobial isolates), and careful comparison with published data would be very useful. We have also spoken to Angela Sessitsch who is willing to help finally prepare the manuscript should you so desire. It would also be a good idea to show the MS to Dr. Esperanza Martinez.

In any event, would you mind incorporating the marked changes into the MS please and returning it to the above address as soon as possible , but in any case not later than August 15. It would greatly facilitate the final type-setting if you could return a printed copy of your chapter along with a copy on a diskette in either MicroSoft Word or WordPerfect for Windows 3.1 or higher please.

We wish you all the very best,

Gudni Hardarson and Bill Broughton,

Seibersdorf, June 27, 1996.

cc. Dr. E. Martinez.

Molecular Biology in Soil Microbial Ecology

edited by:

Gudni Hardarson

Joint FAO/IAEA Programme,
Soil Science Unit,
Agencies Laboratories,
2444 Seibersdorf, Austria.

and

William Broughton,

LBPMS,
University of Geneva,
1292 Chambesy\Geneva, Switzerland.

Contents:

Forward *by* J. Dargie, Director, Joint FAO/IAEA Division

Editorial Note

List of Participants

Acknowledgements

1. Role of legumes in sustainable cropping systems *by* D. Gareth Jones
2. rRNA based identification and detection systems for rhizobia and other bacteria *by* W. Ludwig, R. Amann, E. Martinez, W. Schonhuber, S. Bauer, A. Neef, and K.-H. Schleifer
3. Rapid identification of *Rhizobium* strains *by* targeted PCR fingerprinting *by* X. Perret and W.J. Broughton
4. Use of marker genes in competition studies of *Rhizobium* *by* A. Sessitisch, G. Hardarson, W.M. de Vos, and K.J. Wilson
5. Isolation of unique nucleic acid sequences from rhizobia by genomic subtraction: application in microbial ecology and symbiotic gene analysis *by* J.E. Cooper, A.J. Bjourson, W. Streit, and D. Werner

6. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* as plant growth promoting rhizobacteria with non-legumes: effect on radishes *by* H. Antoun, C.J. Beauchamp, N. Goussard, R. Cchcabot, and R. Lalande
7. Competition in Kenyan soils between *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli strain Kim5 and *R. tropici* strain CIAT899 using the *gusA* marker gene *by* B. Anyango, K. Wilson, and K. Giller
8. Nodulins, utilisation of mineral nitrogen and nitrogen fixation in wild-, landrace- and commercial- varieties of *Phaseolus vulgaris* *by* V.M. Ceccatto, G.A. Sarries, J.E. Gomes, and S.M. Tsai
9. Use of rep-PCR to fingerprint the genomes of *Azospirillum* spp. *by* J.C. Mamaril and L.C. Trinidad
10. Symbiotic performance of some modified *Rhizobium etli* strains in assays with high-nitrogen fixing beans *by* E. Martinez-Romero, I. Hernandez-Lucas, J.J. Pena Cabriales and J.Z. Castellanos
11. Improvement of Biological Nitrogen Fixation in Egyptian Cool Season Legume Crops through better management of *Rhizobium* *by* H. Moawad, S.M.S. Badr El-Din and R.A. Abdel-Aziz

12. Contributions of *Phaseolus vulgaris* landrace varieties and elite rhizobia to yield improvement in subsistence farming systems by W.S. de Oliveira, C. Fagiani, W. Meinhardt, and S.M. Tsai
13. Contributions and limitations of symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* in Romania by A. Popescu
14. Detection of *Bradyrhizobium* spp. and *B. japonicum* in Thailand by direct DNA extraction and primer-based technology by N. Teaumroong, and N. Boonkerd
15. QTL-mapping of nodule number and common bacterial blight under sub-optimal nitrogen levels in *Phaseolus vulgaris* by S.M. Tsai, R.O. Nodari, D.H. Moon, L.E.A. Camargo, R. Vencovsky, and P. Gepts
16. Nitrogen fixation and nodule occupancy by native strains of *Rhizobium* spp. on different cultivars of *Phaseolus vulgaris* by J. Vasquez, J.J. Pena-Cabrales, A. Sessitsch, and E. Martinez-Romero

**Nitrogen Fixation and Nodule Occupancy by Native Strains of
Rhizobium on Different Cultivars of Common Bean (*Phaseolus
vulgaris* L.)**

J. Vásquez-Arroyo¹, A. Sessitsch², E. Martínez³ and J.J. Peña- Cabriaes⁴

- 1 Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, San Nicolas De Los Garza, Nuevo León, Mexico
- 2 FAO/IAEA Agriculture and Biotechnology Laboratory, Soil Science Unit, A-2444 Seibersdorf, Austria
- 3 Centro de Investigación Sobre Fijación de Nitrogeno, UNAM, Apdo. Postal 565-A, Cuernavaca, Mor., Mexico
- 4 Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, Apdo. Postal 629, Irapuato, Gto., Mexico.

Key words: Common bean, ¹⁵N, Rhizobial diversity, *Phaseolus vulgaris*

Abstract

A field experiment under rainfed conditions was conducted in Durango, Mexico, to assess N₂-fixation of three cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using ¹⁵N-methodology. In addition, diversity of rhizobial isolates obtained from nodules of the different plant genotypes was evaluated by intrinsic antibiotic resistance (IAR), PCR using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers, PCR-RFLP analysis of the 16S rRNA gene and multilocus enzyme electrophoresis (MLEE). Selected isolates were used to determine acetylene reduction and competitive ability under greenhouse conditions. The three cultivars tested did not show high variation in N₂-fixation, the %Ndfa values ranged from 18.6 to 26.5. Variability in N₂-fixation efficiency among various native rhizobial isolates was shown to be very high and our results indicate that differences in competitive ability exist also. PCR-RFLP of the 16S rRNA gene and MLEE revealed that most of the isolates are belonging to the species *R. etli*. Intrinsic antibiotic resistance analysis and ERIC-PCR showed high diversity among isolates. In contrast, our results using MLEE show low genetic diversity (H= 0.105).

Introduction

Phaseolus vulgaris L., the common bean, represents the main source of protein for the Mexican people (SAGAR, 1995). Enhancement of its nitrogen-fixing capacity is thus a major agronomic goal. The capacity to fix N_2 is variable among different genotypes of common bean, ranging from 4 to 59 % nitrogen derived from the atmosphere (Hardarson et al., 1993, Peña-Cabriales and Castellanos, 1993; Peña-Cabriales et al., 1993). Breeding programmes with the objective of enhancing nitrogen fixation and yield of common bean are based on this variability. Crop responses to inoculation with selected strains of *Rhizobium* are often low, frequently due to the high competitive ability of native strains. In a survey conducted by Castellanos-Ramos et al. (1993), on field trials during the period 1972 - 1992, only 12% of the trials showed a statistically significant response to inoculation with elite strains. These observations as well as reports demonstrating the large number and diversity of rhizobial strains nodulating common bean in Mexican soils (Aguilar-Zacarias, 1990; Piñero et al. 1988; Araujo et al., 1986) suggest that the problem is complex. Thus, we decided (i) to assess N_2 fixation capacity of three cultivars of *Phaseolus vulgaris* under rainfed conditions using the ^{15}N methodology; (ii) to isolate and characterize indigenous rhizobial strains nodulating different plant genotypes in a region of Mexico in which common bean production is high and (iii) to determine N_2 -fixation and competitive ability of selected isolates.

Materials and Methods

Field experiment and ^{15}N methodology. A field experiment was conducted at the experimental station of INIFAP in Fco. I. Madero Durango, Mexico. The sandy soil had a pH of 6.8 and the organic matter content was 1.04%. Three common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars were planted: Flor de Mayo-M-38 (FM), Negro

Querétaro (Q) and N-3-117 (N). Two non-nodulating crops, barley and non-nodulating common bean (Nod-125; Davis et al., 1988), were used as reference crops for the ^{15}N analysis. The experiment was set up using a randomized block design with four replicates. Each genotype was planted in 5 m rows with 10 cm spacing between plants and 76 cm between rows and a ^{15}N -labelled subplot of 1.5 m rows. After planting, 10 kg N ha^{-1} as ammonium sulphate solution (10.075% a.e.) was applied to the labelled plots. The plots were harvested at physiological maturity (96 days after planting) and the plants were separated into straw and seed, which together were taken to represent total dry matter production. Samples were milled and the nitrogen content was determined by the Kjeldahl procedure (FAO/OIEA, 1987). The percentage nitrogen fixed was calculated using the ^{15}N dilution method (Hardarson, 1990) based on the ^{15}N atom excess data obtained by emission spectrometry.

Strain isolation. A total of 53 *Rhizobium* isolates from eight bean plants were obtained as described by Somasegaran and Hoben (1985) from nodules isolated from flowering plants. Nodules were immersed for 30 sec in 70% ethanol, transferred to 0.1% HgCl_2 , soaked for 3 min and rinsed five times with sterile water. Then, the nodules were crushed with a glass rod in a drop of sterile water. Loops of the nodule suspension were streaked out on yeast mannitol agar (YMA) plates containing Congo red or Bromothymol blue.

Intrinsic Antibiotic Resistance Patterns (IAR). Each isolate was grown in yeast mannitol broth (YMB) for 24 h at 30°C . $100 \mu\text{l}$ of each culture were plated on a YMA plate. Multidisks (12 Sensidisks; Sanofi, Diagnostico Pasteur, Mexico) were placed on the surface and incubated at 28°C for 24 to 48 h. The antibiotics used were: amikacyn $30 \mu\text{g}$, ampicillin $10 \mu\text{g}$, cephalotine $30 \mu\text{g}$, cephatrioxone $30 \mu\text{g}$, chloramphenicol $30 \mu\text{g}$, dicloxaciline $1 \mu\text{g}$, enoxacine $10 \mu\text{g}$, erythromycin $15 \mu\text{g}$, gentamycin $10 \mu\text{g}$, netilmycin $30 \mu\text{g}$, penicillin 10 U, trimethropin-sulphafurzaole $25 \mu\text{g}$.

Isolation of template DNA for Polymerase Chain Reactions (PCR). A loop of cells grown overnight was resuspended in 50 μ l TE, held at -70°C for 4 min, placed on ice for 1 min and put for 2 min in a boiling waterbath. Then, the cells were put on ice for 1 min and boiled for 2 min. Finally, the cell debris was centrifuged at 12000 rpm for 2 min, and the supernatant was used for the PCR reactions (Sessitsch et al., 1996).

PCR using repetitive primers. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers (de Bruijn, 1992) were used to fingerprint native rhizobial strains. PCR amplifications were performed in a total reaction volume of 25 μ l containing 1 x PCR reaction buffer (50 mM KCl; 20 mM Tris.HCl, pH 8.0), 200 μ M each of dATP, dCTP, dGTP and dTTP (Pharmacia-LKB), 3 mM MgCl_2 , 4 μ M ERIC2 primer, 2 μ l of cell extract and 2 U Taq DNA polymerase (Gibco, BRL). All amplifications were performed with a Perkin-Elmer thermocycler (Gene-Amp PCR System 9600) using the following temperature cycle: initial denaturation at 95°C for 1 min, followed by 30 cycles of 20 sec denaturation at 94°C , 30 sec annealing at 40°C and 2 min extension at 72°C . The total reaction volumes were examined by electrophoresis on 1.5% agarose gels.

PCR-RFLP analysis of the 16S rRNA gene. PCR amplification of the 16S rRNA gene and the RFLP analysis was performed as described by Laguerre et al. (1994). PCR conditions were as outlined above using a 100 μ l reaction volume with 8 μ l cell extract and 0.1 μ M primers rD1 and fD1 (Weisburg et al., 1991). Initial denaturation for 1 min at 95°C was followed by 30 cycles of 50s denaturation at 94°C , 1 min annealing at 48°C and 2 min extension at 72°C and a final extension step of 4 min at 72°C . Aliquots of 13 μ l of the amplified DNA were digested with the restriction enzymes *HaeIII*, *AluI*, *TaqI* and *MspI* (Gibco, BRL). The resulting DNA fragments were analyzed by horizontal agarose gel electrophoresis in 2.5% agarose gels.

Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE). Starch gel electrophoresis and selective staining of enzymes was done as described by Selander et al. (1986). Seven enzymes were assayed as follows: NAD-malate dehydrogenase (1.1.1.38) and xanthine-dehydrogenase (1.1.1.204) in tris-citrate, pH 6.7, isocitrate dehydrogenase (1.1.1.42) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (1.1.1.49) in tris-citrate, pH 8.0, phosphoglucomutase (2.7.6.1) and indophenol oxidase (1.11.1.7) in borate, pH 8.2, D-L alanine dehydrogenase (1.4.1.1) in tris-acetate, pH 7.5.

Mobility variants (electromorphs) of each enzyme, numbered in order of decreasing anodal mobility were equated with alleles of the corresponding structural gene. Electromorphic profiles for the seven enzymes (ETs) were equated with multilocus genotypes.

Acetylene reduction activity. Rhizobial isolates representing the nine patterns obtained by ERIC-PCR were grown in YEM broth for 24 h. Seeds of the three cultivars were inoculated with 9×10^8 cells per seed of selected rhizobial isolates (N7, N11, N13, F3, F4, F11, Q14, Q17 and Q21). Plants were grown in Leonard jars using sand as support and a nitrogen-free nutrient solution (Vincent, 1970) and they were removed 47 days after planting. The roots were placed in 650 ml glass containers to assess the acetylene reduction using the technique described by Dart et al. (1972). Acetylene reduction activity was determined using a gas chromatograph with a flame ionization detector and a type N Poropack column.

Competition experiment. A competition experiment was carried out in a growth chamber (Convion) at 19 - 22°C and 14 h photoperiod, where the cultivar Negro Queretaro was grown in pots containing sand. The plants were inoculated seven days after sowing using single inoculations of strains CIAT899::*gusA10* B (Sessitsch et al., 1996), Q16, Q19 or Q21 or mixed inoculations (1:1) of CIAT899::*gusA10* B in combination with either Q16, Q19 or Q21. In all treatments, 6×10^8 cells were applied per seed. Plants were harvested 12 days after inoculation and roots were stained as

described previously (Wilson et al., 1995; Sessitsch et al., 1996) in order to determine nodule occupancy of the *gusA*-marked strain.

Results

Field experiment. During the experiments the climatic conditions were benign and no stresses were recorded. The mean %Ndfa was 22 and the %Ndfas ranged from 26.5 for cv. Negro Queretaro to 18.6 and 20.0 for cvs. FM-M-38 and N-3-117, respectively. These data correlated well with the nodule numbers as Negro Queretaro formed on average 82 nodules per plant while FM-M-38 and N-3-117 formed 52 and 48, respectively (Table 1).

IARs of native rhizobial strains. Twenty-eight different intrinsic antibiotic resistance patterns were obtained. (Tables 2, 3 and 4 show the groupings for each cultivar) Two major groups were mainly composed of isolates obtained from the cultivars Q and FM. The identifying codes given to the rhizobial isolates show the plant genotype from which the strain was isolated.

PCR using repetitive primers. ERIC-PCR gave a large number (26) of patterns (Table 2, 3 and 4). All isolates obtained from different cultivars formed distinct patterns.

PCR-RFLP of the 16S rRNA gene. This analysis was performed in order to classify the isolated rhizobia from common beans into species. The DNA fragment patterns obtained were compared with those from reference strains of various species of *Rhizobium*. Two different patterns were found. One isolate, Q3, showed the same

profile as *R. tropici* type IIA strain CFN299, while the majority of the isolates showed the same pattern as *R. etli*.

Multilocus enzyme electrophoresis. Forty-five isolates were analyzed by MLEE in order to obtain information on the genetic diversity of the isolates. 83 % of the isolates and two strains of *R. etli* including type strain CFN42 showed the same electrottype (ET-1), 17% showed seven different patterns. A mean genetic diversity (H) of 0.105 was calculated.

Acetylene reduction assay. Nine isolates obtained from the different cultivars which were different by ERIC-PCR, were used to inoculate three plant genotypes and the acetylene reduction of the resulting nodules was measured. Amounts of ethylene produced (μM of ethylene plant⁻¹ h⁻¹) ranged from 0.35 to 6.5. Isolates from a given plant genotype did not display improved performance with the corresponding cultivar (Fig. 1).

Competition experiment. The competitive abilities of three strains isolated from cv. Negro Queretaro against *R. tropici* strain CIAT899::*gusA10* B were evaluated. The isolates tested had different IAR and ERIC-PCR patterns (Tables 2, 3 and 4). Isolate Q21 was less competitive than isolates Q16 and Q19 and formed significantly less nodules in the single inoculation treatment (Table 5).

Discussion

Common beans are an important food crop in the Americas and have a high genetic variability for N_2 -fixation (Bliss, 1993; Hardarson et al., 1993; Peña-Cabriaes and Castellanos, 1993; Peña-Cabriaes et al., 1993). The mean %Ndfa (22%) obtained in this study is lower than the values reported previously (Castellanos et al., 1996) for well-watered plants (42% Ndfa) but higher than for plants exposed to drought during the reproductive stage (8.6% Ndfa). The three cultivars tested did not show high variation in N_2 -fixation (%Ndfa values ranged from 18.6 to 26.5). Higher variation was reported by Hardarson et al. (1993). In that study in two states of Mexico, 37 bean cultivars were tested for their N_2 -fixation and %Ndfa ranged from 0 to 58%. The same study revealed that the line Negro Queretaro was one of the best performing lines when grown in Irapuato, Mexico, with a %Ndfa of 50. In our experiments, when the same line was grown in Durango, Mexico, the %Ndfa was only 26.5%. Nevertheless, the cv. Negro Queretaro performed better than the other cvs. tested. The acetylene reduction assays of selected indigenous strains confirmed these findings. Few of the isolates tested showed high acetylene reduction activity and isolates from a given plant genotype did not necessarily show better performance with the corresponding cultivar. Only one isolate obtained from the cv. Negro Queretaro, Q17, had a high N_2 -fixation capacity while the other two isolates, Q14 and Q21, performed poorly on that cultivar. Furthermore, ERIC-PCR results showed that Q14 and Q21 have the same PCR pattern in common with many other nodule isolates, indicating perhaps, that the nodule occupancy of inefficient strains is high. As variability in N_2 -fixation efficiency among various native rhizobial isolates in combination with different plant genotypes was shown to be extremely high, competitive ability has to be considered carefully. Our competition experiment also indicated variability in competitive ability among different native strains. Isolate Q21 showed significantly lower competitive ability than Q16 and Q19 in competing with *R. tropici* strain CIAT899::gusA10 B. Nevertheless, competitive abilities against other indigenous, adapted strains might be

different. Our results indicate that differences among native strains in competition as well as in N_2 -fixation exist. It would be interesting to perform competition experiments with a larger number of isolates under the same conditions as those prevalent in the field from which the isolates were originally obtained.

Intrinsic antibiotic resistance analysis showed high diversity among isolates as was previously reported by Aguilar-Zacarias (1990) with a commercial bean line grown in the state of Zacatecas, Mexico. ERIC-PCR also showed high diversity, but there was no correlation between the antibiotic resistance grouping and ERIC-PCR analysis. Similar results were obtained by van Rossum et al. (1995) on a wide range of *Bradyrhizobium* strains. PCR-RFLP of the 16S rRNA gene and MLEE revealed that most of the isolates are *R. etli*. This is in agreement with previous studies on Mexican rhizobial populations nodulating common bean (Segovia et al., 1993). High genomic instability was reported in *R. etli* (Brom et al., 1991; Flores et al., 1988) perhaps contributing to the diversity of this species. In contrast, using MLEE, our results showed low genetic diversity among the rhizobial isolates ($H=0.105$). The majority of these values correspond to a single electrophoretic type. Values of diversity of common bean nodulating rhizobia reported in the literature range from $H=0.4$ to 0.6 (Souza et al., 1994; Segovia et al., 1991; Demezas et al., 1991; Souza et al., 1990; Piñero et al., 1988; Eardly et al., 1995). Souza et al. (1994) analysed five populations of *R. etli* from Morelos, Mexico, and found a total genetic diversity of $H=0.487$. The authors also suggested that environmental constraints for nodulation may reduce the genetic diversity. Similar observations have been made with indigenous soil populations of *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Leung et al. 1994a, b and c). The reason why only a limited diversity of the *R. etli* population is encountered in nodules in this region remains to be established and may be related to environmental constraints existing in this area.

Analysis of the genetic diversity of rhizobial strains in combination with symbiotic performance and competitive behaviour may allow the identification of strains useful for agricultural purposes. Our data suggest that among the native populations, we

might find successful inoculant strains and further experiments will show whether this approach can improve N₂-fixation in common beans.

References

Aguilar-Zacarias M C 1990 Caracterización de cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli del estado de Zacatecas. Thesis M. Sc. CINVESTAV-Unidad Irapuato, Irapuato, Gto., México.

Araujo R S, Maya-Flores J, Barnes-McConrell D, Yokoyama C, Dazzo F B and Bliss F A 1986 Semiclosed tube cultures of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L) for enumeration of *Rhizobium phaseoli* by the most-probable-number technique. Appl. Environ. Microbiol. 52, 954-956.

Bliss F A 1993 Breeding common bean for improved biological nitrogen fixation. Plant and Soil 152, 71-79.

Brom S, García de los Santos A, Girard M-L, Dávila G, Palacios R and Romero D 1991 High-frequency rearrangements in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli plasmids. J. Bacteriol. 173, 1344-1346.

Castellanos J, Peña-Cabriales J J and Acosta-Gallegos J A 1996 ¹⁵N-determined dinitrogen fixation capacity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars under water stress. J. Agricultural Science, Cambridge, in press.

Castellanos-Ramos J, Peña-Cabriales J J and Rojas-Martinez I 1993 Analisis retrospectivo del uso de inoculantes con cepas elite en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Turrialba 43, 89-99.

Dart P J, Day J M and Harris D 1972 Assay of nitrogenase activity by acetylene reduction. In Use of isotopes for study of fertilizer utilization by legume crops. pp. 85-100. FAO/IAEA, Vienna

Davis J H C, Giller K E, Kipe-Nolt J and Awah A M 1988 Non-nodulating mutants in common bean. Crop Sci. 28, 859-860.

de Bruijn F J 1992 Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2180-2187.

Demezas D H, Reardon T B, Watson J M and Gibson A H 1991 Genetic diversity among *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii strains revealed by alloenzyme and restriction fragment length polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3489-3495.

Eardly B D, Wang F-S, Whittam T S and Selander R K 1995 Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 507-512.

FAO/OIEA 1987 Manual de laboratorio, metododos para análisis de ^{15}N . OIEA Viena.

Flores M, González V, Pardo M A, Leja A, Martínez E, Romero D, Piñero D, Dávila G and Palacios R 1988 Genomic instability in *Rhizobium phaseoli*. *J. Bacteriol.* 170, 1191-1196.

Hardarson G, Bliss F A, Cigales-Rivera M R, Henson R A, Kipe-Nolt J A, Longeri L, Manrique A, Peña-Cabrales J J, Pereira P A A, Sanabria C A and Tsai S M 1993 Genotypic variation in biological nitrogen fixation by common bean. *Plant and Soil* 152, 59-70.

Hardarson G 1990 Use of nuclear techniques in studies of soil-plant relationships. Training course. Serie No.2 IAEA, Vienna.

Laguette G, Allard M-R, Revoy F and Amarger N 1994 Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 56-63.

Leung K, Yap K, Dashti N and Bottomley P J 1994a Serological and ecological characteristics of a nodule-dominant serotype from an indigenous soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 408-415.

Leung K, Strain S R, de Bruijn F J and Bottomley P J 1994b Genotypic and phenotypic comparison of chromosomal types within an indigenous soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 416-426.

Leung K, Wahjage F N and Bottomley P J 1994c Symbiotic characteristics of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii isolates which represent major and minor nodule-occupancy chromosomal types of field-grown subclover (*Trifolium subterraneum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 427-433.

Peña-Cabrales J J, Grageda-Cabrera O A, Kola V and Hardarson G 1993 Time course and N_2 fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Plant and Soil* 152, 115-121.

Peña-Cabrales J J and Castellanos J Z 1993 Effect of water stress on N_2 fixation and grain yield of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil* 152, 151-155.

Piñero D, Martínez F and Selander R K 1988 Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. Appl. Environ. Microbiol. 54, 2825-2832.

SAGAR 1995 Producción y comercialización de frijol 1987-1993. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. Mexico.

Segovia L, Young J P W and Martinez-Romero E 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 43, 374-377.

Segovia, L, Piñero, D, Palacios, R and Martinez-Romero, E 1991 Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. Appl. Environ. Microbiol. 57, 426-433.

Selander R E, Cauganth D A, Ochman H, Musser J M, Gilmour M N and Whittam T S 1986 Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Appl. Environ. Microbiol. 51, 873-884.

Sessitsch A, Jjemba P K, Hardarson G, Akkermans, A D L and Wilson K J 1996 Measurement of the competitiveness index of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 derivatives marked with the *gusA* gene. submitted to Soil Biol. Biochem.

Sessitsch A, Hardarson G, Akkermans A D L and de Vos M 1996 Characterization of *Rhizobium tropici* and other *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. in an Austrian soil. submitted to Molecular Ecology.

Somasegaran P and Hoben H J 1985 Methods in Legume-*Rhizobium* Technology. NifTal Hawaii, USA.

Souza V, Eguiarte L, Avila G, Cappello R, Gallardo C, Montoya J and Piñero D 1994 Genetic structure of *Rhizobium etli* bv. *phaseoli* associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, Mexico. Appl. Environ. Microbiol. 60, 1260-1268.

Souza, V 1990 Genetica y ecología de poblaciones en *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* asociadas a *Phaseolus vulgaris* y a *P. coccineus* silvestres y cultivados, en Morelos, México. Thesis Ph.D. UNAM, México.

van Rossum D, Schuurmans F P, Gillis M, Muyotcha A, van Verseveld H W, Stothamer A H and Boogerd F C 1995 Genetic and phenetic analyses of *Bradyrhizobium* strains nodulating peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots. Appl. Environ. Microbiol. 61, 1599-1609.

Vincent J V 1970 A manual for practical study of root-nodule bacteria. International Biological Program by Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh.

Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A and Lane D J 1991 16S ribosomal DNA amplifications for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 43, 305-313.

Wilson K J, Sessitsch A, Corbo J C, Giller K E, Akkermans A D L and Jefferson R A 1995 β -glucuronidase (GUS) transposons for ecological studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Microbiol.* 141, 1691-1705.

Table 1. Nodule number, % N derived from atmosphere (%Ndfa), % N derived from fertilizer (%Ndff) and % N derived from soil (%Ndfs) in three cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in Francisco I., Madero Durango, Mexico, during the spring and summer 1994.

Cultivar	%Ndfa	%Ndff	%Ndfs	Nodule number
Negro Queretaro	26.5 ^a	7.6 ^a	65.9 ^a	82 ^a
FM-M-38	18.6 ^a	8.6 ^a	72.8 ^a	52 ^b
N-3-117	20.1 ^a	8.7 ^a	71.2 ^a	48 ^b

Means (within one column) are not significantly different from each other at $P = 0.05$ share the same letters as superscripts.

Table 2. Intrinsic antibiotic resistance patterns, ERIC-PCR profiles and MLEE groupings of rhizobial isolates obtained from the *Phaseolus vulgaris* L. cultivar Negro Queretaro.

Rhizobial isolate	IAR	ERIC-PCR	MLEE
Q1	IAR-1	PCR-1	MLEE-1
Q2	IAR-2	PCR-1	MLEE-1
Q3	IAR-3	PCR-2	n.a.*
Q4	IAR-2	PCR-3	MLEE-1
Q5	IAR-2	PCR-3	MLEE-1
Q6	IAR-4	PCR-4	MLEE-1
Q7	IAR-5	PCR-5	MLEE-1
Q8	IAR-6	PCR-3	MLEE-1
Q9	IAR-7	PCR-3	MLEE-1
Q10	IAR-8	PCR-6	MLEE-1
Q12	IAR-9	PCR-7	MLEE-1
Q13	IAR-10	PCR-8	MLEE-1
Q14	IAR-11	PCR-7	MLEE-2
Q15	IAR-12	PCR-7	MLEE-3
Q16	IAR-7	PCR-9	MLEE-4
Q17	IAR-7	PCR-10	MLEE-1
Q18	IAR-13	PCR-10	MLEE-1
Q19	IAR-14	PCR-7	MLEE-5
Q20	IAR-2	PCR-7	MLEE-1
Q21	IAR-12	PCR-11	n.a.
Q22	IAR-2	PCR-11	MLEE-1
Q23	IAR-7	PCR-12	MLEE-1
Q24	IAR-15	PCR-11	MLEE-1
Q25	IAR-16	PCR-7	MLEE-1
Q26	IAR-17	PCR-13	MLEE-1

* n.a. significates not analysed

Table 3. Intrinsic antibiotic resistance patterns, ERIC-PCR profiles and MLEE groupings of rhizobial isolates obtained from the *Phaseolus vulgaris* L. cultivar Flor de Mayo-M-38.

Rhizobial isolate	IAR	ERIC-PCR	MLEE
FM1	IAR-1	PCR-1	MLEE-1
FM2	IAR-2	PCR-2	MLEE-1
FM3	IAR-3	PCR-2	MLEE-1
FM4	IAR-4	PCR-3	MLEE-1
FM5	IAR-5	PCR-4	MLEE-6
FM6	IAR-6	PCR-2	MLEE-1
FM7	IAR-7	PCR-5	MLEE-1
FM8	IAR-8	PCR-2	MLEE-1
FM9	IAR-9	PCR-2	MLEE-1
FM10	IAR-5	PCR-6	MLEE-1
FM11	IAR-5	PCR-7	MLEE-1
FM12	IAR-10	PCR-7	MLEE-1
FM13	IAR-5	PCR-3	MLEE-1
FM14	IAR-5	PCR-7	MLEE-1
FM15	IAR-11	PCR-8	MLEE-1
FM16	IAR-3	PCR-9	MLEE-1
FM17	IAR-12	PCR-10	MLEE-1
FM18	IAR-12	PCR-11	MLEE-1

Table 4. Intrinsic antibiotic resistance patterns, ERIC-PCR profiles and MLEE groupings of rhizobial isolates obtained from the *Phaseolus vulgaris* L. cultivar N-3-117.

Rhizobial isolate	IAR	ERIC-PCR	MLEE
N1	IAR-1	PCR-1	MLEE-1
N7	IAR-2	PCR-2	MLEE-1
N8	IAR-3	PCR-3	MLEE-1
N9	IAR-4	PCR-4	MLEE-1
N10	IAR-5	PCR-5	MLEE-2
N11	IAR-5	PCR-6	MLEE-1
N12	IAR-6	PCR-7	MLEE-1
N13	IAR-5	PCR-7	MLEE-1
N14	IAR-7	PCR-6	MLEE-3
N15	IAR-7	PCR-8	MLEE-1

Table 5. Number of nodules formed on cv. Negro Queretaro in a competition experiment to determine the competitive ability of three native isolates against strain CIAT899::*gusA10 B*.

STRAIN	NODULE NUMBER PLANT ⁻¹		
	Single inoculation	1:1 Mixed inoculation GUS-marked strain	Unmarked strain
Q16	107 ^a	4 ^b	96 ^a
Q19	108 ^a	7 ^b	103 ^a
Q21	67 ^b	43 ^a	24 ^b
CIAT899:: <i>gusA10 B</i>	90 ^a		

Means (within one column) that are not significantly different from each other at P = 0.05 share the same letters as superscripts.

Fig. 1 Effect of common bean cultivar and rhizobial strain on acetylene reduction activity at flowering.

